



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ιστολογική ανάλυση των γονάδων του αχινού *Paracentrotus lividus*
(Lamarck, 1816) στον Παγασητικό κόλπο**

Σταμούλη Αικατερίνη

ΒΟΛΟΣ 2012

«Ιστολογική ανάλυση των γονάδων του αχινού *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) στον Παγασητικό κόλπο»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Δημήτριος Βαφείδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Βιοποικιλότητα Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και Άμεση – Έμμεση χρηστικότητα τους. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***.
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.
- 3) **Μαριάνθη Χατζηιωάννου**, Λέκτορας, Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

Στην οικογένεια μου

*The business of animals is to stay alive
until they reproduce themselves, and...*

*the business of zoologist is to try
to understand how they do it*

E.J.W. Barrington

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες, σε όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν για να φέρω σε πέρας την παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία.

Πρώτο από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της διατριβής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Βαφείδη, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε την υλοποίηση μίας τόσο μεγάλης και σοβαρής μελέτης. Τον ευχαριστώ ακόμα, που κατά τα πέντε χρόνια φοίτησης μου στο Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, με δίδαξε και με μύησε στο μαγευτικό κόσμο της επιστήμης της θάλασσας.

Ακόμα θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εξαδάκτυλο Αθανάσιο και τη Λέκτορα κ. Χατζηγιάννου Μαριάνθη, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ, μέσα από την καρδιά μου, οφείλω στον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Λόλα Αλέξιο για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και έμπνευση που μου παρείχε τα τελευταία δύο χρόνια. Χωρίς τις καίριες παρεμβάσεις του αλλά και την αμέριστη βοήθεια του, η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής θα ήταν αδύνατη. Εύχομαι να εμπνεύσει κι άλλους φοιτητές, όπως έκανε και με εμένα.

Τέλος η πραγματοποίηση αυτής της διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση των φίλων και κυρίως της οικογενείας μου, που είναι και οι χορηγοί των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ιστολογική ανάλυση και εκτίμηση των σταδίων ωριμότητας των γονάδων του κοινού αχινού *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), στον Παγασητικό κόλπο.

Πραγματοποιήθηκαν 24 μηνιαίες δειγματοληψίες (Δεκέμβριος 2008 – Νοέμβριος 2010), σε δύο περιοχές κατά μήκος της ακτογραμμής του Παγασητικού κόλπου. Σε κάθε δειγματοληψία γίνονταν τυχαία συλλογή 40 ατόμων με αυτόνομη κατάδυση (SCUBA diving) και μέτρηση και καταγραφή του ολικού νωπού βάρους σώματος και του νωπού βάρους των γονάδων των ατόμων. Από τα παραπάνω υπολογίστηκε ο γοναδοσωματικός δείκτης (GSI). Ακολουθούσε ιστολογική ανάλυση των γονάδων με τη μη προοδευτική χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Σύμφωνα με τα στάδια ωριμότητας των θηλυκών γονάδων υπολογίστηκε ο δείκτης ωριμότητας (MI).

Συνολικά συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν ιστολογικά 1.521 άτομα (539 αρσενικά, 943 θηλυκά και 39 ερμαφρόδιτα). Στον Αγ. Στέφανο, η μέση τιμή του ολικού βάρους σώματος υπολογίστηκε σε $62,00 \pm 23,42$ g, του βάρους των γονάδων σε $2,619 \pm 2,331$ g, ενώ ο GSI, κατά μέσο όρο είχε τιμή $3,91 \pm 2,75$. Αντίστοιχα στην Κάτω Γατζέα, η μέση τιμή του ολικού βάρους σώματος υπολογίστηκε σε $62,82 \pm 21,95$ g, του βάρους των γονάδων $2,786 \pm 1,93$ g, ενώ ο GSI, κατά μέσο όρο είχε τιμή $4,29 \pm 2,45$. Για τις γονάδες των θηλυκών ατόμων περιγράφηκαν 5 στάδια ωριμότητας και για τις γονάδες των αρσενικών 4.

Το είδος φάνηκε να ακολουθεί εποχικό αναπαραγωγικό κύκλο με δύο περιόδους αναπαραγωγής, μία στα τέλη άνοιξης (Μάρτιο – Μάιο) και μία κατά τους πρώτους χειμερινούς μήνες (Νοέμβριο - Ιανουάριο). Τέλος η έρευνα έδειξε πως τα θηλυκά

άτομα ήταν κυρίαρχα έναντι των αρσενικών με αναλογία 1,7:1 καθώς και ότι το είδος εμφανίζει φαινόμενα ερμαφροδιτισμού, σε σχετικά υψηλά ποσοστά (2,56%).

Λέξεις κλειδιά: Εχινόδερμα, ιστολογική ανάλυση, γοναδοσωματικός δείκτης, δείκτης ωριμότητας, Αιγαίο.

Keywords: Echinodermata, histological analysis, gonadosomatic index, maturity index, Aegean sea.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Σκοπός.....	3
1.2 Μελέτη της Αναπαραγωγής.....	4
1.2.1 Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI)	4
1.2.2 Ιστολογική Ανάλυση.....	6
1.3 Το είδος <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)	7
1.3.1 Βιολογία του <i>Paracentrotus lividus</i>	9
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	14
2.1 Περιοχή Μελέτης.....	14
2.2 Σταθμοί Δειγματοληψίας.....	15
2.3 Δειγματοληψίες	16
2.4 Μορφομετρικές μετρήσεις	17
2.5 Ιστολογική ανάλυση	18
Α. Εγκλεισμός σε παραφίνη	18
Β. Τομή δειγμάτων	20
Γ. Χρώση	21
2.6 Παρατήρηση και καταγραφή	23

2.7 Δείκτης Ωριμότητας (MI).....	32
2.8 Στατιστική Επεξεργασία.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
3.1 Θερμοκρασία	34
3.2 Μορφομετρικές Μετρήσεις	36
3.3 Ιστολογική Ανάλυση	41
3.3.1 Αναλογία φύλων	41
3.3.2 Στάδια ωριμότητας γονάδων	43
3. 4 Παρουσία Ερμαφρόδιτων ατόμων.....	68
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74
5.1 Ξένη βιβλιογραφία.....	74
5.2 Ελληνική βιβλιογραφία	76
6. ABSTRACT	78

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θάλασσα αποτελεί ένα τεράστιο φυσικό πόρο για την ανθρώπινη ευμάρεια. Προμηθεύει τον άνθρωπο τροφή, φάρμακα και πρώτες ύλες και υποστηρίζει σε μεγάλο βαθμό τον τουρισμό ανά τον κόσμο. Ακόμα η θαλάσσια ζωή συμβάλει αποφασιστικά στη διαμόρφωση της φύσης του πλανήτη μας, διότι αποτελεί μία μεγάλη δεξαμενή διάλυσης διοξειδίου του άνθρακα και παράγει το μεγαλύτερο μέρος οξυγόνου που αναπνέουμε (Castro & Huber 1999).

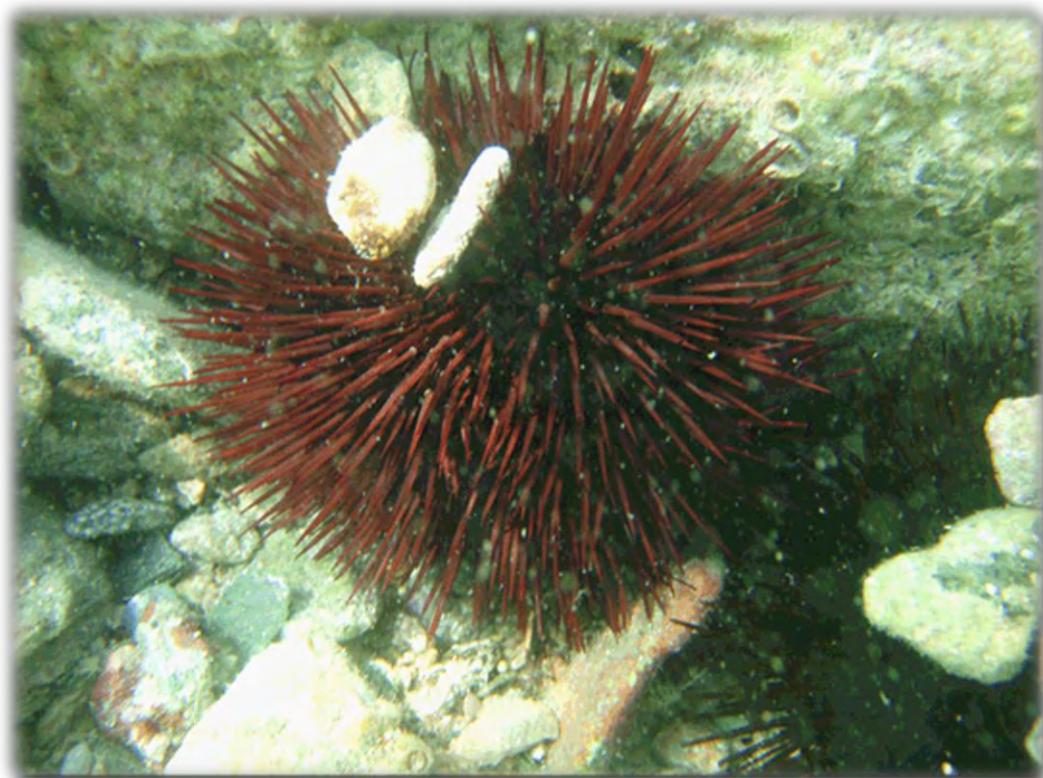
Το γεγονός ότι η θάλασσα είναι γεμάτη από edώδιμα είδη, έκανε τους ανθρώπους να ασχοληθούν με αυτή από πολύ παλιά. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι, εξαιτίας της αχανούς έκτασης και του βάθους των ωκεανών, οι αλιευτικοί πόροι είναι ανεξάντλητοι. Όμως σήμερα γνωρίζουμε πως αυτό δεν ισχύει, μιάς και τα περισσότερα αποθέματα σε παγκόσμιο επίπεδο είναι υπεραλιευμένα, ενώ πολλά είναι και εκείνα που κινδυνεύουν με κατάρρευση (Στεργίου και συν. 2011).

Εκτός από την υπεραλίευση βέβαια ο άνθρωπος προκαλεί και άλλου είδους επιδράσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η υποβάθμιση των υδάτων λόγω της ρύπανσης αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό πρόβλημα του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αφού η φθορά και η καταστροφή των ενδιαιτημάτων, αποτελούν τις κυριότερες αιτίες εξαφάνισης των θαλάσσιων ειδών (Lawrence & Hemingway 2003).

Για να γίνει ταυτόχρονα, ολοκληρωμένη και σοφή χρήση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων ή να προβλεφτούν οι επιπτώσεις των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στο θαλάσσιο περιβάλλον, χρειάζεται να γίνουν γνωστά όσα περισσότερα γίνετε για τη ζωή μέσα σε αυτό.

Η διαχείριση των αλιευτικών αποθεμάτων στην Ελλάδα, όπως και στην υπόλοιπη Μεσόγειο, εμφανίζεται στατική, με τα νομοθετικά πλαίσια να μην αναπροσαρμόζονται με την πάροδο των χρόνων. Όμως για να έχει αποτέλεσμα ένα νομοθετικό μέτρο διαχείρισης, θα πρέπει αυτό να στηρίζεται σε επιστημονικά δεδομένα, που θα δίνουν πληροφορίες για τη δυναμική του οικοσυστήματος και για τις στρατηγικές ζωής του εκάστοτε οργανισμού.

Ένα από τα είδη που αλιεύονται, όλο και περισσότερο κατά τις τελευταίες δεκαετίες στη λεκάνη της Μεσογείου είναι και ο αχινός *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Εικ. 1.1). Πρόκειται για τον κοινό αχινό που συναντάμε σε αφθονία στις ελληνικές θάλασσες. Το είδος έχει χαρακτηριστεί από αρκετούς επιστήμονες ως είδος – κλειδί των υποπαριακτών κοινοτήτων (Guettaf et al. 2000, Ourens et al. 2010), κυρίως λόγω του καθοριστικού ρόλου που παίζει στη διατήρηση της ισορροπίας της μακροφυτικής βιομάζας (Pinna et al. 2009). Η μελέτη του κύκλου ζωής και των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου είδους λοιπόν, εμφανίζει αρκετό ενδιαφέρον.



Εικόνα 1.1. Ο κοινός αχινός *Paracentrotus lividus*

1.1 Σκοπός

Σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη του αναπαραγωγικού κύκλου του κοινού αχινού *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), με πεδίο έρευνας τον Παγασητικό κόλπο (κεντρικό Αιγαίο). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, θα εμπλουτίσουν τη γνώση γύρω από τη βιολογία του είδους και ενδεχομένως να συνεισφέρουν στο μέλλον στην κατάρτιση σχεδίων για τη διαχείριση και διατήρηση των αποθεμάτων αυτού του σημαντικού για το θαλάσσιο οικοσύστημα οργανισμού.

1.2 Μελέτη της Αναπαραγωγής

Αρκετά ασπόνδυλα απλά απελευθερώνουν τους γαμέτες τους στην υδάτινη στήλη όπου και πραγματοποιείται η γονιμοποίηση. Σε είδη που ακολουθούν αυτό το αναπαραγωγικό μοντέλο, ο συγχρονισμός της απελευθέρωσης του γεννητικού υλικού είναι κρίσιμη προϋπόθεση για την επιτυχία της γονιμοποίησης (Brusca & Brusca 2003).

Η ακριβής έναρξη και διάρκεια της αναπαραγωγής παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση των αποθεμάτων ιδίως όταν αυτή στηρίζεται σε χρονικές απαγορεύσεις, καθώς θα ήταν καταστροφικό για ένα απόθεμα να αλιεύεται λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της περιόδου που αυτό αναπαράγεται. Στην περίπτωση αυτή το απόθεμα δεν θα είναι σε θέση να δημιουργήσει απογόνους και μέσα σε μερικές γενεές θα καταρρεύσει. Η γνώση λοιπόν της χρονικής περιόδου που οι οργανισμοί αναπαράγονται, ιδιαίτερα εκείνοι που αποτελούν αλιεύματα, είναι πολύ σημαντική.

Για τον προσδιορισμό της περιόδου που ένα είδος έχει επιλέξει να αναπαράγεται χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι από τους ερευνητές. Οι δύο κυρίαρχοι είναι: η εκτίμηση του γοναδοσωματικού δείκτη και η ιστολογική ανάλυση των γονάδων του οργανισμού.

1.2.1 Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI)

Ο πιο κοινός και πλέον εύχρηστος δείκτης αναπαραγωγικής δραστηριότητας, είναι ο γοναδοσωματικός δείκτης (GSI). Ο GSI, συσχετίζει το βάρος των γονάδων των ατόμων με κάποια σωματική παράμετρο τους (συνήθως το ολικό βάρος σώματος) και χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγικής περιόδου πληθυσμών (Ourens et al. 2010).

Κατά την περίοδο όπου ο οργανισμός ετοιμάζεται για την αναπαραγωγή, οι γαμέτες (ωοκύτταρα και σπερματοκύτταρα) ωριμάζουν αυξάνοντας σε μέγεθος και βάρος, σε αντιστοιχία με αυτούς αυξάνει και το βάρος των γονάδων, με αποτέλεσμα ο γοναδοσωματικός δείκτης να παίρνει υψηλότερες τιμές (Jons and Miranda 1997). Κατά την αναπαραγωγή οι γονάδες αδειάζουν, καθώς οι γαμέτες απελευθερώνονται στην υδάτινη στήλη, και η τιμή του GSI μειώνεται.

Αυτές οι αυξομειώσεις του δείκτη δίνουν μια πρώτη ένδειξη για την περίοδο που ένας οργανισμός αναπαράγεται. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται κατά την ερμηνεία αυτών των κορυφών, καθώς η απότομη μείωση του δείκτη μπορεί να μην οφείλεται σε απελευθέρωση γεννητικού υλικού, αλλά σε άλλους παράγοντες όπως τα αποθέματα των γονάδων σε θρεπτικά συστατικά (Martinez – Pitta et al. 2008) ή η ποιότητα και η διαθεσιμότητα της τροφής (Pearse & Cameron 1991, Sanchez – Espana et. al. 2004).

Μελέτες έχουν αναδείξει πως ο γοναδοσωματικός δείκτης δεν είναι αξιόπιστο εργαλείο στη μελέτη της αναπαραγωγής των εχινοειδών και ιδιαίτερα των αχινών (Lozano et al. 1995, Sanchez – Espana et. al. 2004, Sellem & Guillou 2007 για τον *Paracentrotus lividus*; Martinez – Pitta et al. 2007 για τον *Sphaerechinus granularis*), κυρίως λόγω του διττού ρόλου των γονάδων των οργανισμών αυτών, όργανα αναπαραγωγής αλλά και αποθήκες θρεπτικού υλικού (Gonzalez –Irusta et al. 2009).

Επιπρόσθετα ο γοναδοσωματικός δείκτης ως όργανο μακροσκοπικής εκτίμησης της αναπαραγωγής, δεν μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με το φύλο του ατόμου που εξετάζεται, όταν ο οργανισμός δε χαρακτηρίζεται από σαφή εξωτερικό φυλετικό διμορφισμό, όπως οι αχινοί. Η πλειοψηφία των εχινοδέρμων είναι δίοικα παρόλα αυτά υπάρχουν και ερμαφρόδιτα είδη ανάμεσα στις κλάσεις των αστεροειδών, των

ολοθούριων και ιδίως των οφίουρων (Brusca & Brusca 2003). Ακόμα μέσω του γοναδοσωματικού δείκτη δεν μπορεί να γίνει αναγνώριση των σταδίων ωριμότητας των γαμετών ενός οργανισμού.

1.2.2 Ιστολογική Ανάλυση

Η ιστολογία είναι η επιστήμη που μελετά τη μορφολογία των κυττάρων ως συστατικών στοιχείων των ιστών και των οργάνων του σώματος (Κουσουλάκος 2007). Με την ευρύτερη έννοια του όρου, η ιστολογία ταυτίζεται με τη Μικροσκοπική Ανατομική. Ασχολείται με τη μελέτη της λεπτής δομής των ιστών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μελέτη και κατανόηση της λειτουργίας τους, τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές διεργασίες (Μιχαήλ 1991). Πρακτικά η ιστολογική ανάλυση στηρίζεται σε μία σειρά μεθόδων και τεχνικών με κυρίαρχη τη χρήση του μικροσκοπίου.

Για να μπορέσει ένα δείγμα να εξεταστεί μικροσκοπικά, θα πρέπει να είναι αρκετά λεπτό και διαυγές και οι δομικές λεπτομέρειες του να παρουσιάζουν αυξημένη αντίθεση. Οι συνήθεις ιστοί που προορίζονται για ιστολογική ανάλυση προέρχονται από δείγματα με αρκετά μεγάλη και στέρεα εσωτερική δομή. Στην περίπτωση αυτή η διαδικασία που ακολουθείται είναι η όσο το δυνατόν λεπτότερη τομή του ιστού και η διαφορετική χρώση του, ώστε να γίνουν ορατά τα ποικίλης χημικής υφής συστατικά του (Kierman 2005).

Η ιστολογία αποδείχθηκε αρκετά χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της αναπαραγωγής διότι έδωσε στον ερευνητή τη δυνατότητα να παρατηρήσει τις γονάδες του οργανισμού που μελετάει, από το εσωτερικό.

Με τον τρόπο αυτό γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός των σταδίων ωριμότητας των γονάδων των ατόμων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν αξιόπιστα συμπεράσματα για τον αναπαραγωγικό κύκλο των οργανισμών και για την ακριβή έναρξης αλλά και διάρκειας της αναπαραγωγικής περιόδου.

Επιπρόσθετα με τη μικροσκοπία καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση του φύλου οργανισμών που δεν εμφανίζουν σαφή εξωτερικό διμορφισμό, όπως οι αχινοί, μέσα από την παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων των αναπαραγωγικών οργάνων των ατόμων που εξετάζονται. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτή και η αξιολόγηση τυχόν φαινομένων ερμαφροδιτισμού, κάτι που έχει παρατηρηθεί και στον κοινό αχινό *P. lividus* (Byrne 1990), που χωρίς την παρατήρηση του εσωτερικού των γονάδων είναι αδύνατη, για οργανισμούς που δεν εμφανίζουν εξωτερικές μορφολογικές διαφοροποιήσεις των αναπαραγωγικών τους οργάνων.

Φαίνεται λοιπόν πως τόσο γενικά όσο και ειδικά στην περίπτωση των εχινοειδών, η ιστολογικά ανάλυση αποτελεί την πλέον έγκυρη και αξιόπιστη μέθοδο στην εκτίμηση τόσο του φύλου των ατόμων, όσο και του σταδίου ωριμότητας των γονάδων τους και κατ'επέκταση και της περιόδου αναπαραγωγής.

1.3 Το είδος *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Ο κοινός αχινός *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), είναι ένα από τα πιο γνωστά είδη βενθικών ασπόνδυλων των ελληνικών θαλασσών και ένα από τα 24 είδη εχινοειδών που απαντώνται στο Αιγαίο (Koukouras et al. 2007). Το είδος αλιεύεται εκτεταμένα σε επίπεδο Μεσογείου, καθώς οι γονάδες του αποτελούν κομμάτι των γαστριμαργικών προτιμήσεων των μεσογειακών λαών από τα αρχαία ακόμα χρόνια.

Στις ελληνικές θάλασσες η αλιεία του περιορίζεται κυρίως στη νησιωτική χώρα και σε τουριστικά θέρετρα.

Η εκτεταμένη αλιεία του είδους, έχει οδηγήσει στη μείωση των φυσικών πληθυσμών, γεγονός που αναδεικνύεται από αρκετές μελέτες κατά τις τελευταίες δεκαετίες (Allain 1975, Grosjean 2001), με χαρακτηριστικότερο το παράδειγμα της Γαλλίας όπου τη δεκαετία του 1970, το φυσικό απόθεμα του είδους κατέρρευσε (Allain 1975).

Τα τελευταία χρόνια τα παραπάνω φαινόμενα αρχίζουν να εμφανίζονται και στις ελληνικές θάλασσες, με την κατάσταση στα ελληνικά νησιά να έχει χειροτερεύσει αισθητά, εντάσσοντας το είδος στο Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας και χαρακτηρίζοντας το ως τρωτό VU(A2d) (Λεγάκης & Μαραγκού 2009). Τα μόνα μέτρα διατήρησης των φυσικών πληθυσμών του είδους που υπάρχουν σήμερα είναι ουσιαστικά θεσμικά, καθώς απλά περιλαμβάνεται στο παράρτημα III της Σύμβασης της Βέρνης και στο παράρτημα III της Σύμβασης της Βαρκελώνης και στο Πρωτόκολλο για τις Ειδικές Προστατευόμενες Περιοχές και τη Βιολογική Ποικιλότητα στη Μεσόγειο.

Αν και το είδος παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον τόσο οικονομικό όσο και οικολογικό (Guettaf et al. 2000, Sellem & Guillou 2007), παρόλα αυτά οι σχετικές πληροφορίες από την Ανατολική Μεσόγειο και τις ελληνικές θάλασσες είναι περιορισμένες και αφορούν κυρίως τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του είδους (Λόλας 2008, Antoniadou & Vafidis 2009), ενώ οι αναφορές για την αναπαραγωγή των τοπικών πληθυσμών στηρίζονται, στη συντριπτική πλειοψηφία τους, σε δεδομένα μόνο του γοναδοσωματικού δείκτη.

1.3.1 Βιολογία του *Paracentrotus lividus*

Όπως σε όλους τους κανονικούς αχινούς έτσι και στο υπό μελέτη είδος, ο ενδοσκελετός σχηματίζει ένα σφαιρικό, σκληρό όστρακο με κινητά αγκάθια και βαδιστικούς ποδίσκους. Η μετακίνηση επιτυγχάνεται με τα κινητά αυτά αγκάθια που αρθρώνονται σε επάρματα του σκελετού και τους βαδιστικούς ποδίσκους.

Ο *P. lividus*, είναι κατά κανόνα φυτοφάγος οργανισμός και τρέφεται τόσο από προσκολλημένο όσο και από ελεύθερο φυτικό υλικό. Ωστόσο, η μελέτη του στομαχικού περιεχομένου αχινών που έχουν συλλεχθεί από διάφορα περιβάλλοντα, δείχνουν ότι οι τροφές ζωικής προέλευσης όχι μόνο δεν αποφεύγονται αλλά μερικές φορές αναζητούνται ενεργά. Στις περιοχές όπου δεν υπάρχει «ανορθωμένη» βλάστηση ο *P. lividus* δεν πραγματοποιεί καμιά επιλογή στην τροφή του και γίνεται παμφάγος (Λεγάκης & Μαραγκού 2009). Το είδος φαίνεται έχει ιδιαίτερη προτίμηση στο χλωροφύκος *Ulva sp.* καθώς και στο φανερόγαμο *Pocidonia oceanica* (L.) Delile. Όταν οι πληθυσμοί του είδους βρεθούν σε μεγάλη πυκνότητα μπορεί να μετατρέψουν τα λιβάδια του αγγειόσπερμου σε άγονες εκτάσεις, με σημαντικό αντίκτυπο στη βενθική κοινότητα (Privitera et al. 2008). Το στόμα, που έχει φορά προς τα κάτω φέρει ένα πολύπλοκο σύστημα σιαγόνων και μυών, γνωστό ως «λύχνος του Αριστοτέλη», το οποίο χρησιμοποιείτε από το ζώο για την απόσπαση της τροφής από το υπόστρωμα.

Έρευνες συσχετίζουν τη χαμηλή συγκέντρωση των φανερόγαμων με την αναπαραγωγική περίοδο του είδους, ενώ υπάρχει αναφορά και για χαμηλότερη βοσκητική δραστηριότητα κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες που σχετίζεται με την αναπαραγωγική συμπεριφορά του ζώου (Peirano et al. 2001).

1.3.1.1 Το Αναπαραγωγικό Σύστημα του *Paracentrotus lividus*.

Το αναπαραγωγικό σύστημα του αχινού, είναι σχετικό απλό και αντικατοπτρίζει την πεντακτινωτή συμμετρία του σκελετού του ζώου. Όπως όλοι οι κανονικοί αχινοί έτσι και ο *P. lividus* έχει 5 γονάδες διατεταγμένες συμμετρικά στην κοιλιακή κοιλότητα, κάθε μία από τις οποίες συνδέεται με έναν αγωγό. Οι αγωγοί αυτοί εκτείνονται μέχρι την εδρική επιφάνεια του κελύφους και από εκεί μέσα από ειδικές οπές, τους γονοπόρους, διοχετεύουν τους ώριμους γαμέτες στο περιβάλλον (Brusca & Brusca 2003).

Η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα στην υδάτινη στήλη. Η «αντίδραση» σπερματοζωαρίου – ωαρίου είναι πολύ ειδική χάρη στην παρουσία ειδικών υποδοχέων και αντιγόνων που επιτρέπουν μόνο σπερματοζωάρια του ίδιου είδους να εισέλθουν στα ωάρια (Κουσουλάκος 2007). Από τα γονιμοποιημένα αυγά αναπτύσσεται μία χαρακτηριστική πλαγκτική προνύμφη. Αυτό το στάδιο διαρκεί μερικές εβδομάδες, κατά τις οποίες η προνύμφη αναπτύσσει σταδιακά 4, 6 και 8 βραχίονες.

Μετά από μερικές εβδομάδες η προνύμφη αρχίζει την αναζήτηση στερεού υποστρώματος για να προσκολληθεί και να μεταμορφωθεί. Για να ξεκινήσει η διαδικασία της μεταμόρφωσης, η οποία δε διαρκεί πάνω από μία ώρα, είναι απαραίτητο το κατάλληλο χημικό ερέθισμα (Gosselin & Jangoux 1996). Η μεταλάρβα μοιάζει με μικρογραφία ενήλικου ατόμου, χωρίς ωστόσο να έχουν δημιουργηθεί η έδρα και το στόμα. Μέσα στην επόμενη εβδομάδα το άτομο υφίσταται καθοριστικές βιολογικές αλλαγές και αναπτύσσει ένα πλήρες και λειτουργικό πεπτικό σύστημα που του επιτρέπει να εισέλθει στο στάδιο της εξωγενούς διατροφής.

Όπως σχεδόν όλα τα εχινοειδή, ο *P. lividus* είναι γονοχωριστικό είδος, χωρίς ωστόσο να αποκλείονται και οι περιπτώσεις ερμαφρόδιτων ατόμων (Byrne 1990). Δεν υπάρχει σαφής εξωτερικός φυλετικός διμορφισμός και έτσι η διάκριση των φύλων καθίσταται εφικτή μόνο μετά από ανατομία και παρατήρηση του εσωτερικού των ατόμων. Το κυριότερο χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για τη διάκριση των δύο φύλων, είναι το χρώμα των γονάδων και του γεννητικού τους εκκρίματος (Εικ. 1.2, 1.3). Στα θηλυκά άτομα οι γονάδες έχουν κόκκινο – πορτοκαλί χρώμα με παρόμοιου χρώματος έκκριμα ενώ τα αρσενικά άτομα εμφανίζουν κίτρινες γονάδες με λευκό – φαιοκίτρινο γεννητικό έκκριμα (Gago et al. 2003).

Αν και η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα γρήγορο και εύχρηστο μακροσκοπικό προσδιορισμό, παρόλα αυτά δεν είναι πάντα ακριβής, καθώς πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως το χρώμα των γονάδων και του γεννητικού εκκρίματος δεν αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό του φύλου, τουλάχιστον όσο αφορά τα μύδια (Petes et al. 2008).



Εικόνα 1.2. Γονάδες πιθανόν αρσενικού ατόμου, με λευκό γεννητικό έκκριμα.



Εικόνα 1.3. Γονάδες πιθανόν θηλυκού ατόμου, με πορτοκαλί γεννητικό έκκριμα.

Όσο αφορά την περίοδο αναπαραγωγής του είδους, αυτή ποικίλει ανάλογα με την περιοχή (Πιν. 1.1), και αρκετές αναφορές υπάρχουν για το συσχετισμό της έναρξης της με τη φωτοπερίοδο (Shpigel et al. 2004), τη θερμοκρασία της υδάτινης στήλης και τη διαθεσιμότητα τροφής (Spirlet et al. 2000). Αναφορές για μία περίοδο αναπαραγωγής υπάρχουν για τον Ατλαντικό ωκεανό (Byrne 1990, Bayed et al. 2005, Ourens et al. 2010) και για ορισμένες περιοχές της Μεσογείου θάλασσας (Lozano et al. 1995: για τη Β/Δ Μεσόγειο, Sellem & Guillou, 2007: για τη Ν/Α Μεσόγειο κ.α.). Ενώ δε λείπουν και οι αναφορές για την ύπαρξη δύο περιόδων αναπαραγωγής κυρίως για τους πληθυσμούς περιοχών της Μεσογειακής λεκάνης (Fenaux 1968, Guettaf et al. 2000: για τη Ν/Δ Μεσόγειο, ακτές Αλγερίας, Ourens et al. 2010 κ.α.).

Πίνακας 1.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση του αριθμού των περιόδων αναπαραγωγής του *Paracentrotus lividus*

Αναφορά	Περιοχή μελέτης	Αριθμός περιόδων αναπαραγωγής	Περίοδοι αναπαραγωγής
Fenaux 1968		2	
Byrne 1990	Δυτικές ακτές Ιρλανδίας	1	Μάιο/Ιούνιο – Αύγουστο/Σεπτέμβριο
Lozano et al. 1995	B/Δ Μεσόγειος	1	Άνοιξη – Αρχές Καλοκαιριού
Guettaf et al. 2000	N/Δ Μεσόγειος Ain Tagourait Αλγερία	1	Φεβρουάριο – Μάρτιο
Guettaf et al. 2000	N/Δ Μεσόγειος Alger Beach Αλγερία	2	Απρίλιο – Μάιο Αύγουστο – Σεπτέμβριο
Guettaf et al. 2000	N/Δ Μεσόγειος El Marsa Αλγερία	2	Απρίλιο – Ιούνιο Οκτώβριο – Δεκέμβριο
Bayed et al. 2005	Ατλαντικός ωκεανός (Μαρόκο)	1	Μάρτιος – Μάιος
Λόλας 2008	Παγασητικός κόλπος, (κεντρικό Αιγαίο)	2	Άνοιξη Φθινόπωρο
Gonzalez – Irustra et al. 2009	Ατλαντικός ωκεανός (Βискаϊκός κόλπος)	2	
Ourens et al. 2010	Ατλαντικός ωκεανός	1	Μάιο – Ιούνιο
Ourens et al. 2010	Μεσόγειος θάλασσα	2	Απρίλιο – Ιούνιο Σεπτέμβριο – Νοέμβριο

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Περιοχή Μελέτης

Πεδίο έρευνας ήταν ο Παγασητικός κόλπος. Πρόκειται για έναν ημίκλειστο και σχετικά αβαθή κόλπο που βρίσκεται στο κεντρικό Αιγαίο πέλαγος. Η συνολική επιφάνεια του κόλπου είναι 529 Km^2 , με μέσο όγκο 36 km^3 και μέσο βάθος 69 m (Petithakis et al. 2005).

Παρόλο που ο κόλπος δε δέχεται εισροές από μεγάλα ποτάμια, ωστόσο υπάρχει σημαντική εισροή θρεπτικών μέσω του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα. Τα υπόγεια νερά της Θεσσαλικής λεκάνης απορροής, εμπλουτίζονται από τις χρήσεις γης, τόσο της εκτεταμένης γεωργικής δραστηριότητας του Θεσσαλικού κάμπου, όσο και από την αστικοποίηση και βιομηχανοποίηση της ευρύτερης περιοχής. Επί προσθέτως, ιδιαίτερη επιρροή στον κόλπο έχει και το αστικό κέντρο του Βόλου, που βρίσκεται στο βόρειο τμήμα του (Petithakis et al. 2005).

Τα νερά που κόλπου είναι κρύα και καλά ομογενοποιημένα κατά του χειμερινούς μήνες (μέση θερμοκρασία $12,5^\circ\text{C}$), ενώ κατά τους θερμούς μήνες του χρόνου εμφανίζουν στρωμάτωση και αυξημένες θερμοκρασίες (μέση τιμή $27,4^\circ\text{C}$), ακολουθώντας το πρότυπο της ατμοσφαιρικής θερμοκρασίας.

Η αλατότητα εμφανίζει διακυμάνσεις από 32 έως 38 psu, με την τιμή να αυξάνει με το βάθος, λόγω των χαμηλής αλατότητας επιφανειακών εισροών από το Αιγαίο (Triandafillou et al. 2001).

Σε αντίθεση με άλλες ημίκλειστες λεκάνες, ο Παγασητικός κόλπος έχει χαρακτηριστεί ως μέσο – oligotροφικός κόλπος, με περιόδους περιορισμένων συγκεντρώσεων αζώτου και φωσφόρου (Petithakis et al. 2005).

2.2 Σταθμοί Δειγματοληψίας

Η έρευνα βασίστηκε σε δεδομένα από δύο πληθυσμούς του Παγασητικού κόλπου. Η επιλογή των δύο σταθμών στηρίχθηκε σε προγενέστερη μελέτη, σχετικά με τη δομή και τη δυναμική των πληθυσμών του κόλπου που πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Βενθικών Ασπόνδυλων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (Λόλας 2008). Επιλέχθηκαν δύο περιοχές δειγματοληψίας κατά μήκος της ακτογραμμής του Παγασητικού κόλπου, ο Αγ. Στέφανος και η Κάτω Γατζέα (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1. Χάρτης του Παγασητικού κόλπου και οι περιοχές δειγματοληψιών

Ο Αγ. Στέφανος είναι ένας ημίκλειστος κολπίσκος σχετικά προφυλαγμένος από τον κυματισμό. Το υπόστρωμα περιμετρικά του κόλπου είναι σκληρό με βλάστηση που απαρτίζεται κυρίως από ροδοφύκη αρκετά από αυτά κοραλλιοειδή και φαιοφύκη όπως

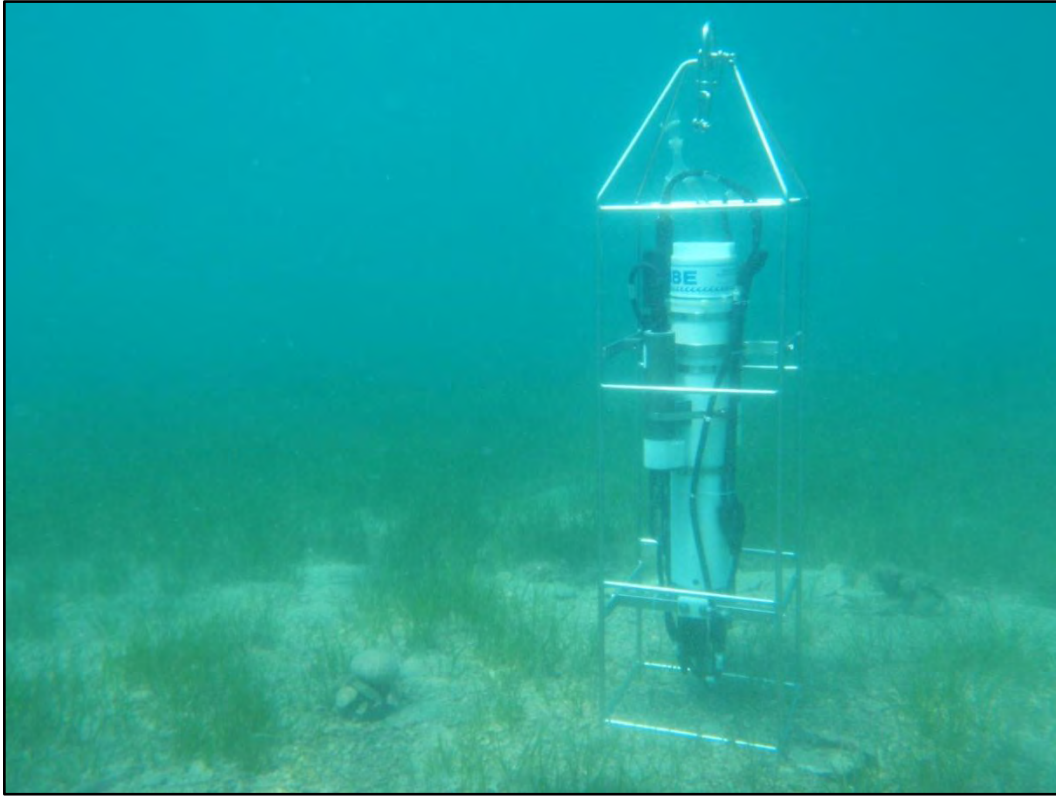
τα *Padina pavonica* και *Cystoseira sp.*, ενώ κατά μήκος της ακτογραμμής εμφανίζει κινητό υπόστρωμα με έντονη την παρουσία του φανερόγαμου *Zostera marina*. Τα άτομα που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν από το σκληρό υπόστρωμα της περιοχής.

Ο κόλπος της Κάτω Γατζέας, βρίσκεται παράλληλα στην ακτογραμμή του Παγασητικού, γεγονός που καθιστά την περιοχή αρκετά εκτεθειμένη στον κυματισμό. Ο πυθμένας είναι αμμώδης – αμμοϋλιώδης και χαρακτηρίζεται από εναλλαγή κινητού – σκληρού υποστρώματος. Η βλάστηση είναι αραιή και αποτελείται κυρίως από τα αγγειόσπερμα *Zostera marina* και *Halophila stipulacea*.

2.3 Δειγματοληψίες

Πραγματοποιήθηκαν 24 μηνιαίες δειγματοληψίες, από το Δεκέμβριο του 2008 έως και τον Νοέμβριο του 2010. Έγινε προσπάθεια οι δειγματοληψίες να πραγματοποιούνται κάθε 2^ο δεκαπενθήμερο του μήνα, έτσι ώστε το χρονικό περιθώριο ανάμεσα τους να παραμένει σταθερό.

Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν τυχαία συλλογή 40 ατόμων, με αυτόνομη κατάδυση (SCUBA) και καταγραφή της θερμοκρασίας με ειδικό αυτογραφικό όργανο, CTD (Εικ. 2.2)



Εικόνα 2.2 Το ειδικό αυτογραφικό όργανο, CTD, που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών

2.4 Μορφομετρικές μετρήσεις

Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, τα άτομα μεταφέρονταν, μέσα σε δοχεία σταθερού όγκου 35 L γεμάτα με θαλασσινό νερό, στο εργαστήριο Βενθικών Ασπόνδυλων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ακολουθούσε η μέτρηση και καταγραφή των παρακάτω βιομετρικών παραμέτρων:

Ολικό νωπό βάρος σώματος (W_t): το βάρος του ζώου αμέσως μετά την απομάκρυνση του από το δοχείο μεταφοράς (κατά τη μέτρηση τα άτομα ήταν ζωντανά).

Νωπό βάρος γονάδων (W_g): το βάρος των 5 γονάδων αμέσως μετά την αφαίρεση τους από του κέλυφος.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιούνταν μέσα σε 4 - 6 ώρες για να είναι τα άτομα όσο το δυνατόν πιο φρέσκα.

Οι μετρήσεις των βιομετρικών παραμέτρων, πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας 0,001 g και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του γοναδοσωματικού δείκτη. Πιο συγκεκριμένα ο δείκτης υπολογίστηκε ως το ποσοστό συμμετοχής του βάρους των γονάδων στο ολικό βάρος των ζώων.

$$\text{GSI} = \frac{Wg}{Wt} \times 100$$

Ο γοναδοσωματικός δείκτης στη συνέχεια συσχετίστηκε με τη θερμοκρασία της υδάτινης στήλης.

Οι γονάδες των ατόμων μετά από τη διαδικασία των μετρήσεων τοποθετούνταν σε αριθμημένα φιαλίδια με μονιμοποιητικό διάλυμα αιθανόλης 70% προκειμένου να διατηρηθούν μέχρι την ιστολογική ανάλυσή τους.

2.5 Ιστολογική ανάλυση

Για την αναγνώριση του φύλου και τον προσδιορισμό του σταδίου ωριμότητας των γονάδων των ατόμων, πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση με τη μη προοδευτική χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης. Η συγκεκριμένη τεχνική, χωρίζεται σε 3 στάδια: τον εγκλεισμό του ιστού, την τομή του δείγματος και τη χρώση.

A. Εγκλεισμός σε παραφίνη

Για να γίνει εφικτή η τομή και χρώση του ιστού, πρέπει το παρασκεύασμα να διαποτιστεί και να εγκλειστεί μέσα σε ένα αδρανές και στερεό σε θερμοκρασία δωματίου υλικό. Το συνηθέστερο μέσο εγκλεισμού είναι οι παραφίνη, διότι είναι εύχρηστη και σχετικά φθηνή. Το σημείο τήξης της ποικίλει από 40 – 70 °C. Ο τύπος της παραφίνης που θα χρησιμοποιηθεί και το σημείο τήξης της, έχει ιδιαίτερη σημασία

για την κοπή των δειγμάτων και εξαρτάται από το κλίμα της περιοχής που λαμβάνει χώρα η ιστολογική μελέτη. Στην Ελλάδα, συνήθως χρησιμοποιείται παραφίνη με σημείο τήξης μεταξύ 53 – 57 °C (Λόλας 2008).

Για να είναι δυνατή η παραφίνωση του ιστού, πρέπει ο ιστός προηγουμένως να έχει αφυδατωθεί. Για να γίνει αυτό τα δείγματα συνήθως εμβαπτίζονται σε αιθυλική αλκοόλη. Επειδή όπως και το νερό ούτε η αιθανόλη αναμιγνύεται με την παραφίνη, γίνετε αντικατάσταση της με άλλο υγρό που έχει την ικανότητα να αναμιγνύεται τόσο με αυτή όσο και με την παραφίνη. Η ξυλόλη και η φορμόλη αποτελούν τέτοιου είδους μέσα, που χρησιμοποιούνται ευρύτερα στα ιστολογικά πρωτόκολλα. Ακολουθεί η παραφίνωση του ιστού. Σε αυτό το στάδιο ο ιστός εμβαπτίζεται σε υγρή παραφίνη, η οποία προσδίδει στον ιστό την κατάλληλη σταθερότητα που χρειάζεται για να ακολουθήσει η κοπή του στη μικροτόμο.

Ο εγκλεισμός του ιστού σε παραφίνη πραγματοποιήθηκε για τμήμα 1 cm δείγματος σε ιστοκινέτα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο TP 1020 της εταιρίας LEICA (Εικ. 2.3). Για την αφυδάτωση του ιστού τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθυλικής αλκοόλης. Και το μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την αντικατάσταση της ήταν η ξυλόλη.



Εικόνα 2.3. Η ιστοκινέτα που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλεισμό των ιστών σε παραφίνη

B. Τομή δειγμάτων

Για να μπορέσει ένα δείγμα να εξεταστεί μικροσκοπικά, θα πρέπει να είναι αρκετά λεπτό και διαυγές και οι δομικές λεπτομέρειες του να παρουσιάζουν αυξημένη αντίθεση.

Η κοπή των δειγμάτων έγινε σε μικροτόμο (Εικ. 2.4), με πάχος τομής 8 μm .



Εικόνα 2.4 Η μικροτόμος που χρησιμοποιήθηκε για την τομή των δειγμάτων

Γ. Χρώση

Η χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης είναι ίσως η πιο ευρέα χρησιμοποιούμενη χρώση στα ιστολογικά εγχειρίδια, λόγω της ευκολίας στη χρήση αλλά και της δυνατότητας της να περιγράφει με μεγάλη ακρίβεια ένα αρκετά μεγάλο φάσμα διαφορετικών δομών των ιστών.

Η αιματοξυλίνη είναι μια φυσική χρωστική που εξάγεται από το δέντρο *Haematoxylon campechianum* που ευδοκimeί στην Ονδούρα και στην Κεντρική Αμερική. Λόγω της μείωσης των φυσικών πληθυσμών των *H. campechianum*, οι μεγαλύτερες ποσότητες αιματοξυλίνης που κυκλοφορούν σήμερα στο εμπόριο είναι συνθετικές. Ως αλκαλική χρωστική παρουσιάζει μια τάση να χρωματίζει τα νουκλεϊκά οξέα του κυτταρικού πυρήνα με μπλε χρώμα.

Η ηωσίνη από την άλλη, ως όξινη χρωστική βάφει το κυτταρόπλασμα του κυττάρου σε διάφορες αποχρώσεις του ροζ και έτσι καθίσταται δυνατή η παρατήρηση του εσωτερικού των κυττάρων του ιστού με μεγάλη ευκολία.

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι χρώσης, η προοδευτική (progressive) και η μη προοδευτική (regressive). Στην προοδευτική χρώση η χρωστική αφήνεται να δράσει σταδιακά ώσπου να παρατηρηθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αντίθετα, στη μη προοδευτική χρώση, το δείγμα αφήνεται για αρκετή ώρα στο διάλυμα της χρωστικής και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα νερού ή αλκοόλης ή όξινης αλκοόλης για να αφαιρεθεί σιγά σιγά μέρος της χρωστικής μέχρι το επιθυμητό αποτέλεσμα (Kierman 2005).

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η μη προοδευτική χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης, στηριζόμενοι σε προγενέστερες μελέτες που χρησιμοποίησαν την ίδια τεχνική ιστολογικής ανάλυσης για γονάδες αχινών με επιτυχία (Ιωαννίδη 2011). Στην Εικόνα 2.5 φαίνεται η τελική μορφή των παρασκευασμάτων με την ολοκλήρωση της ιστολογικής ανάλυσης.



Εικόνα 2.5 Ιστολογικά παρασκευάσματα στην τελική μορφή τους

2.6 Παρατήρηση και καταγραφή

Η παρατήρηση των τομών πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο με ενσωματωμένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (ProgRes Plus 2.1) και η λήψη των φωτογραφιών σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με το μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Progres Capture 2.1 (Εικ. 2.6).



Εικόνα 2.6 Το μικροσκόπιο και ο Η/Υ που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση και τη λήψη φωτογραφιών των ιστολογικών παρασκευασμάτων

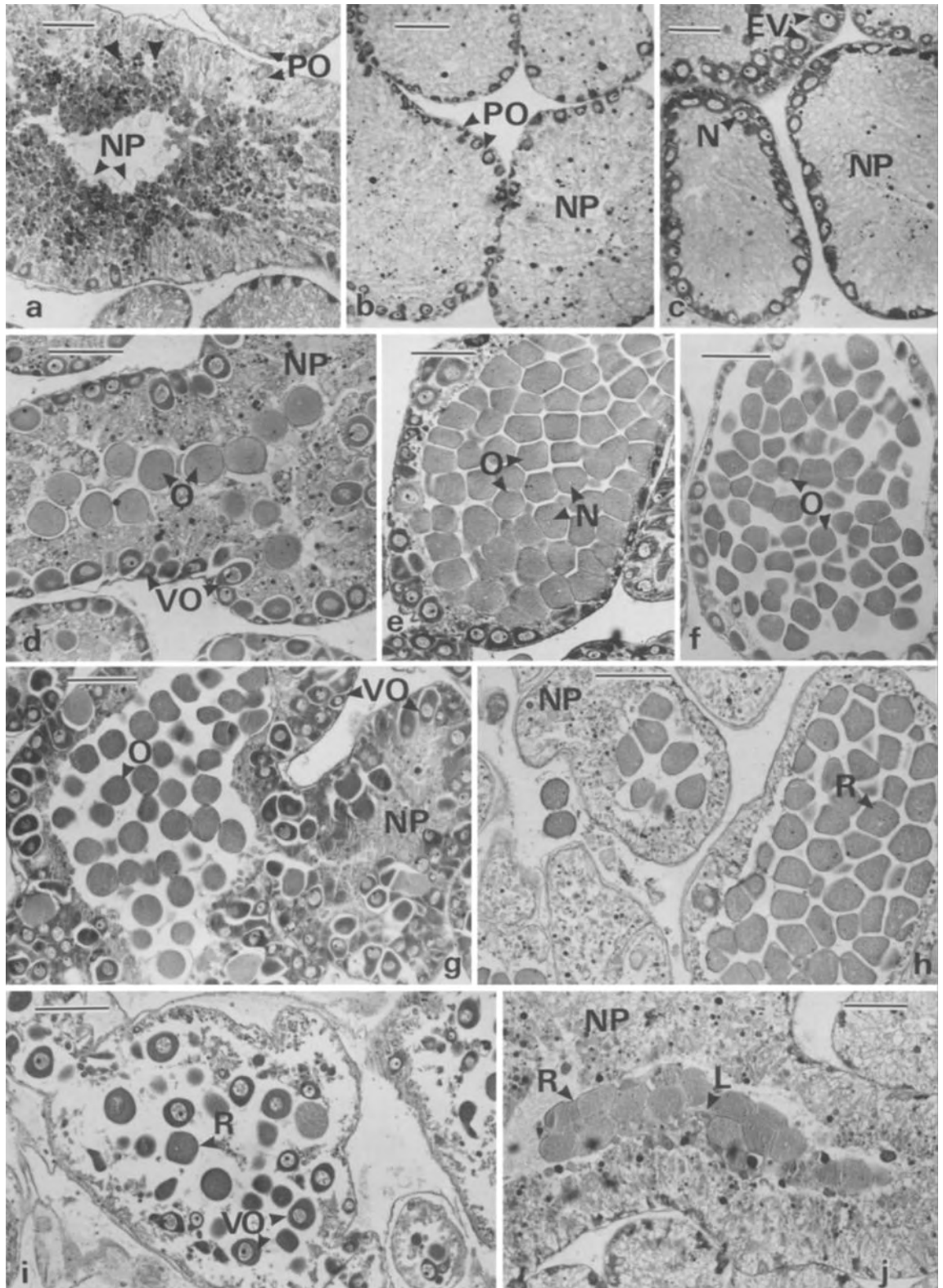
Η αναγνώριση του φύλου και η ταυτοποίηση του σταδίου ωριμότητας των γονάδων του κάθε ατόμου, στηρίχθηκαν σε αντίστοιχες μελέτες που αφορούν το είδος *P. lividus* από την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία.

Πιο συγκεκριμένα, ο Byrne (1990), χρησιμοποίησε μία κλίμακα 6 σταδίων ωριμότητας για το κάθε φύλο ως εξής: *στάδιο I*: στάδιο αναδιοργάνωσης (recovery stage), *στάδιο II*: στάδιο ανάπτυξης (growing stage), *στάδιο III*: ανώριμο στάδιο (premature stage), *στάδιο IV*: ώριμο στάδιο (mature stage), *στάδιο V*: στάδιο ωοτοκίας (partly spawned stage) και *στάδιο VI*: κενές γονάδες (spent stage). (Εικ. 2.7, 2.8).

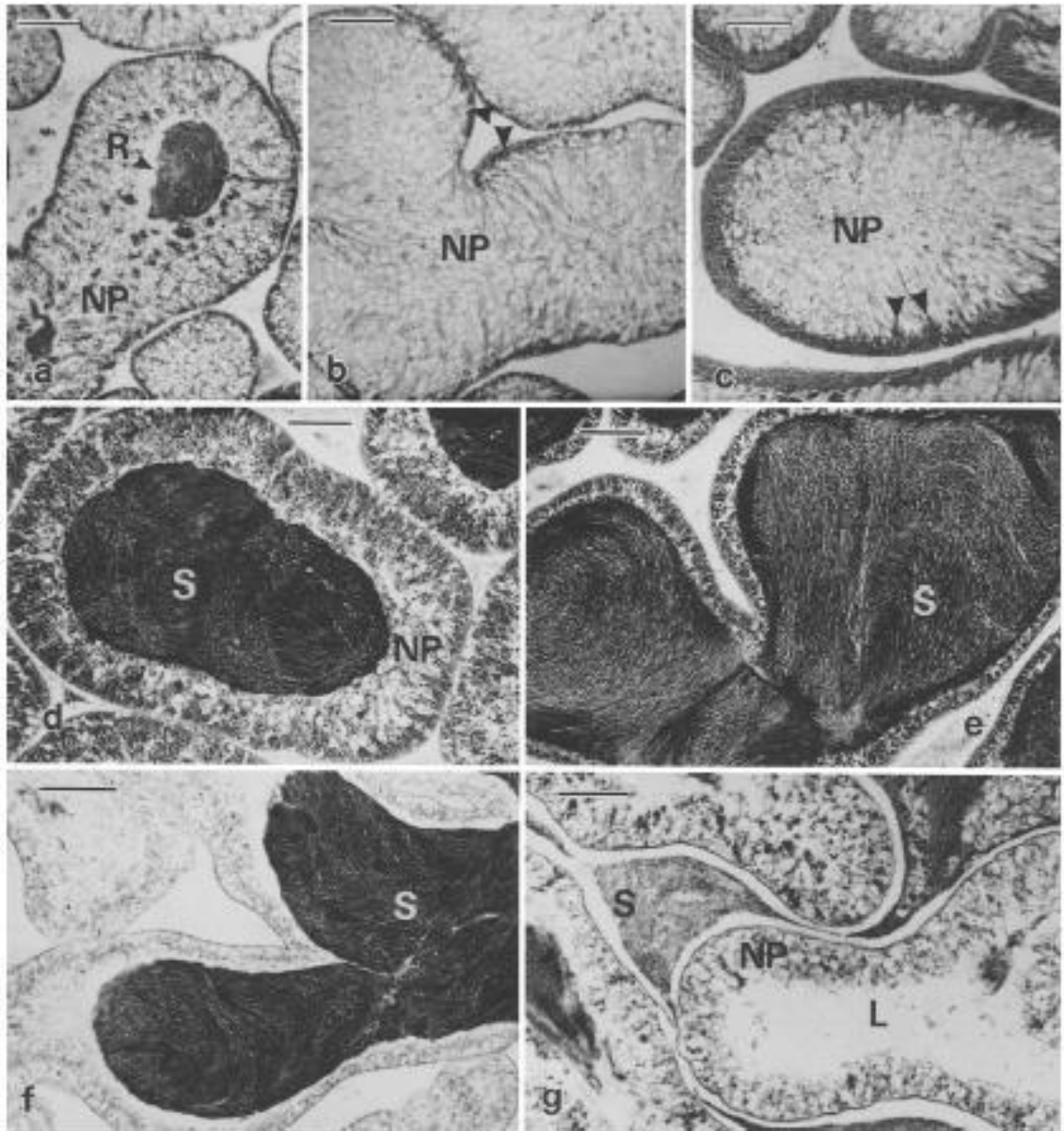
Μερικά χρόνια αργότερα οι Spirlet et al. (1998), εξελίσσοντας την κλίμακα του Byrne, αναγνώρισαν 8 στάδια και για τα δύο φύλα. Αναλυτικά τα στάδια αυτά ήταν: *στάδιο I*: κενές γονάδες με υπολειμματικά ωοκύτταρα και σπέρμα (spent with relict gametes in the resorbing process), *στάδιο II*: εντελώς κενές γονάδες (spent empty),

στάδιο *III*: αναδιοργάνωση (recovery), στάδιο *IV*: ανάπτυξη (growing), στάδιο *V*: ανώριμοι γαμέτες (premature), στάδιο *VI*: ώριμοι γαμέτες (mature), στάδιο *VII*: στάδιο ωοτοκίας (partly spawned), στάδιο *VIII*: προχωρημένη ωοτοκία (post spawned) (Εικ. 2.9).

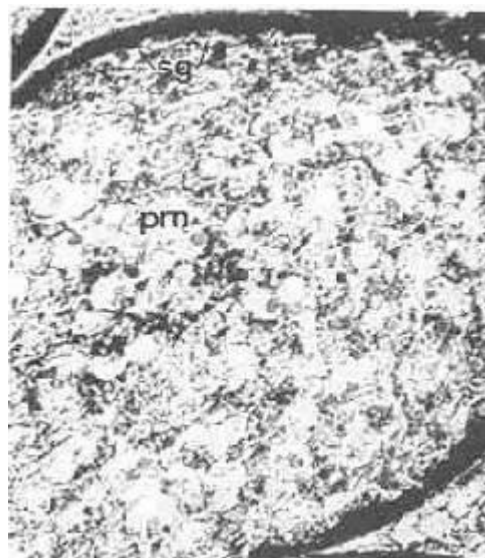
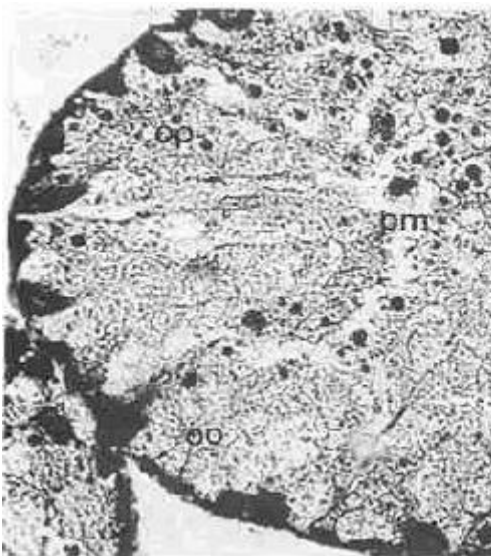
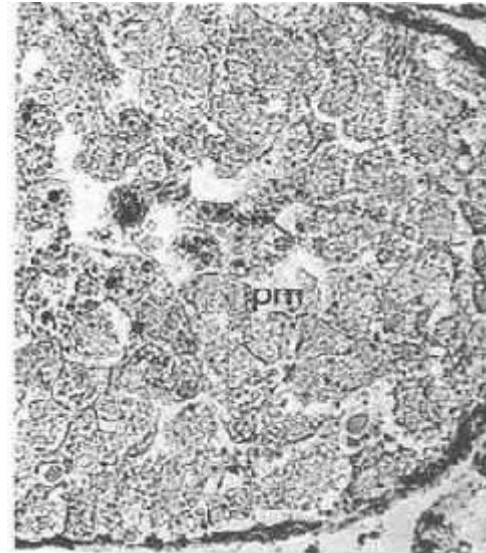
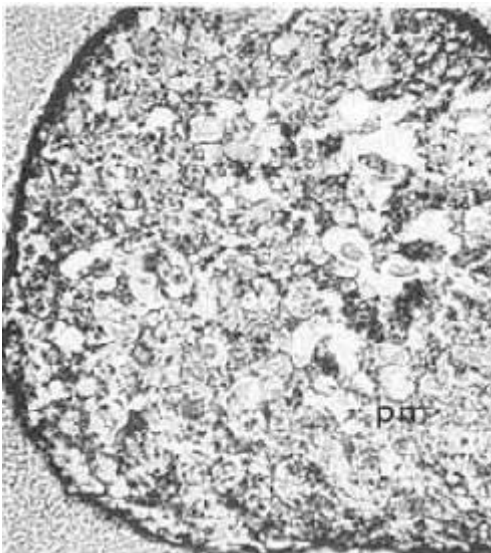
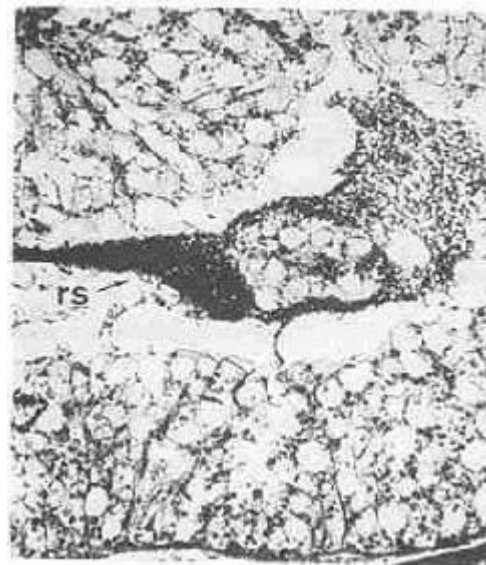
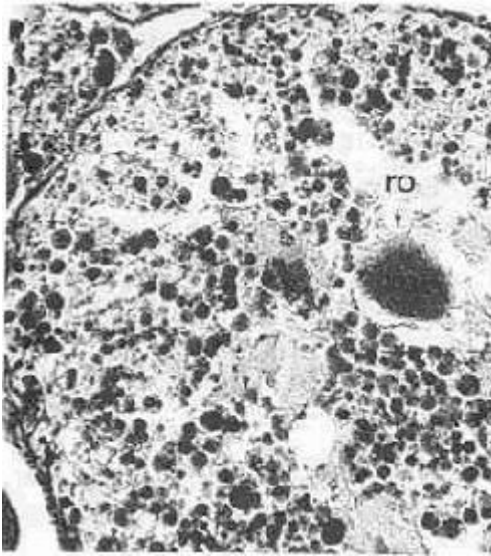
Η πιο πρόσφατη προσέγγιση είναι αυτή των Sancez – Espana et al. (2004), οι οποίοι προσδιόρισαν 4 στάδια ωριμότητας για τα θηλυκά άτομα και 2 για τα αρσενικά. Συγκεκριμένα για τα θηλυκά άτομα προσδιορίστηκαν τα εξής στάδια: H1: κενές γονάδες (spent condition), H2: ωρίμανση ωοκυττάρων (phase of oocyte maturation), H3: ώριμα ωοκύτταρα (mature state with ova) και H4: στάδιο αναδιοργάνωσης των γονάδων με το μέγιστο πάχος του θρεπτικού υλικού (phase of gonadal reconstitution with maximum thickness of the nutritive layer). Για τα αρσενικά: στάδιο M0: κενές γονάδες (spent condition), στάδιο M1: ώριμες γονάδες με παρουσία σπέρματος (mature gonad with sperm) (Εικ. 2.10).

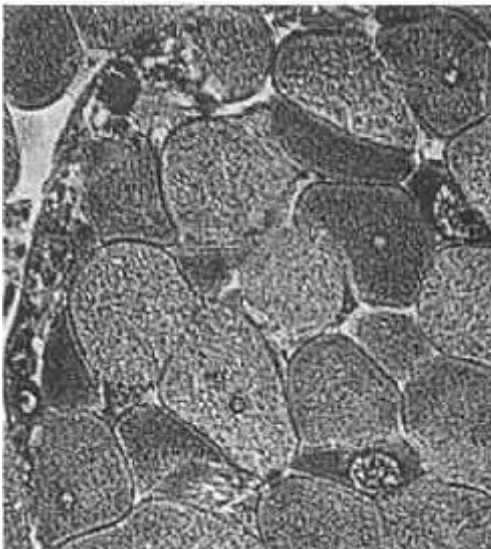
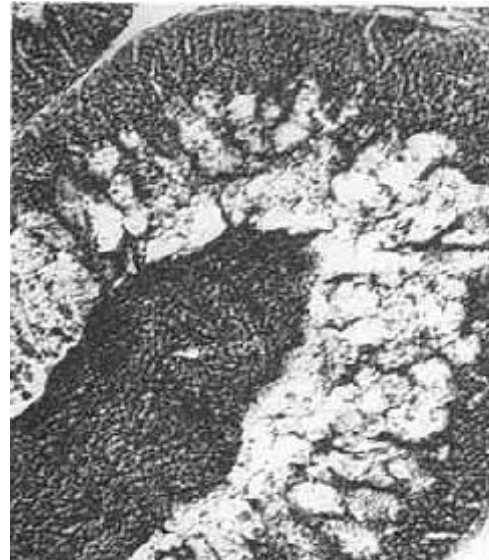
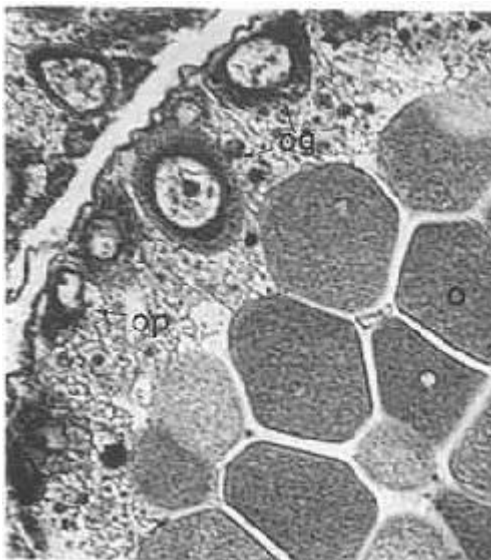
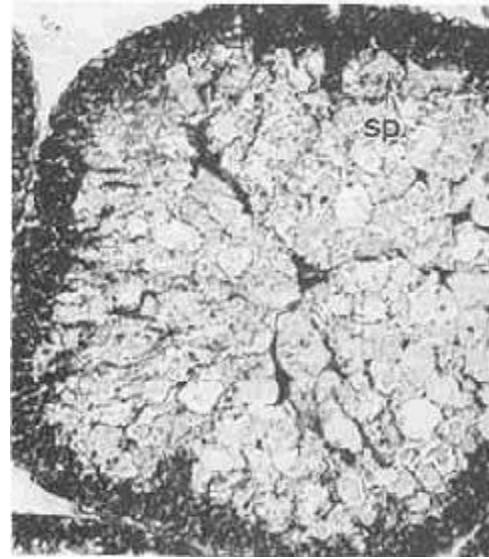


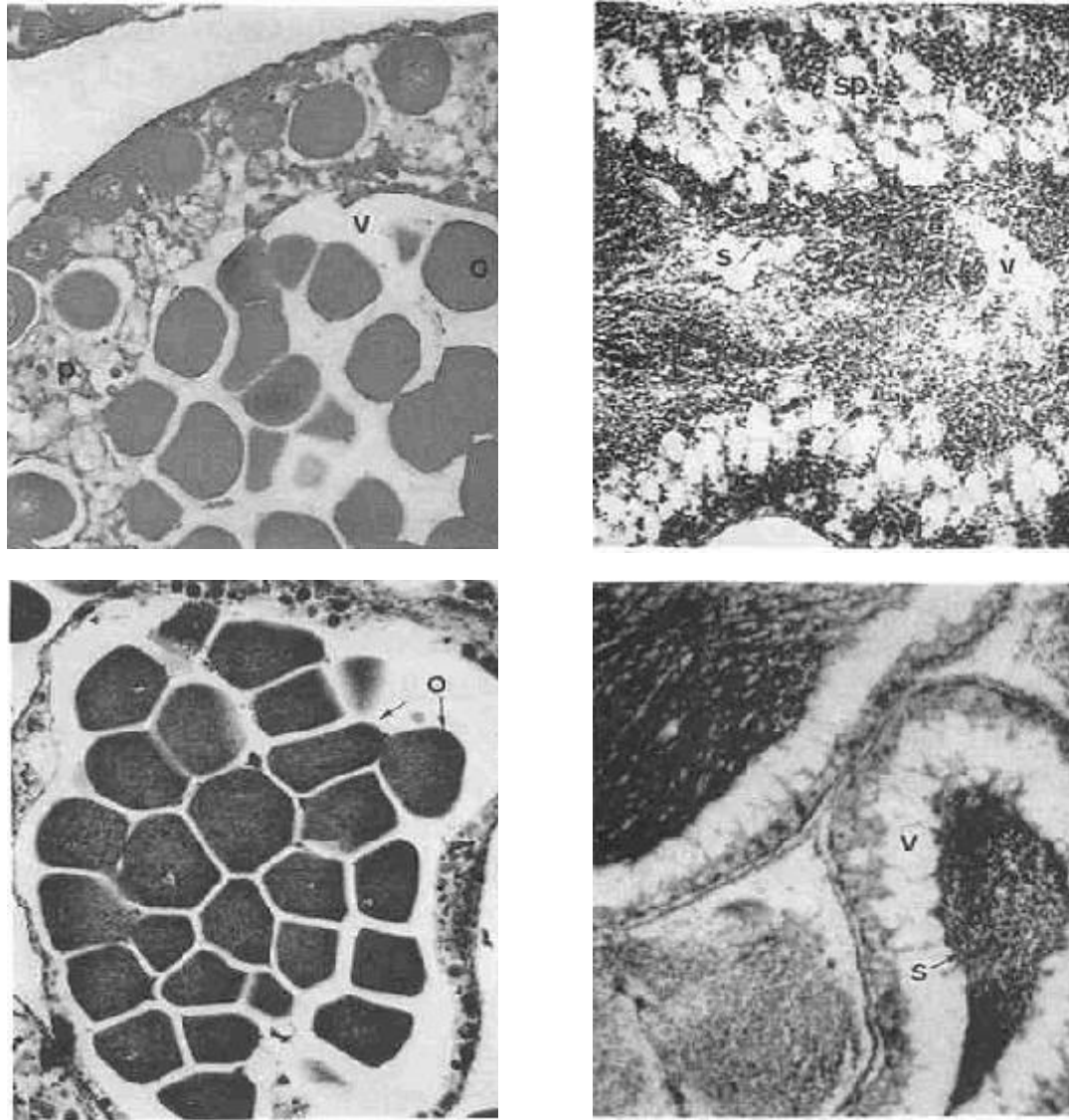
Εικόνα 2.7 Στάδια ωριμότητας των γονάδων των θηλυκών ατόμων του *P. lividus* (Μοντέλο 6 σταδίων για τα θηλυκά άτομα). a.,b. Στάδιο I, c. Στάδιο II, d. Στάδιο III, e. Στάδιο IV, f.,g Στάδιο V, h.,i. Στάδιο VI, j. Γονάδες ανάμεσα στα στάδια VI και I (Byrne 1990).



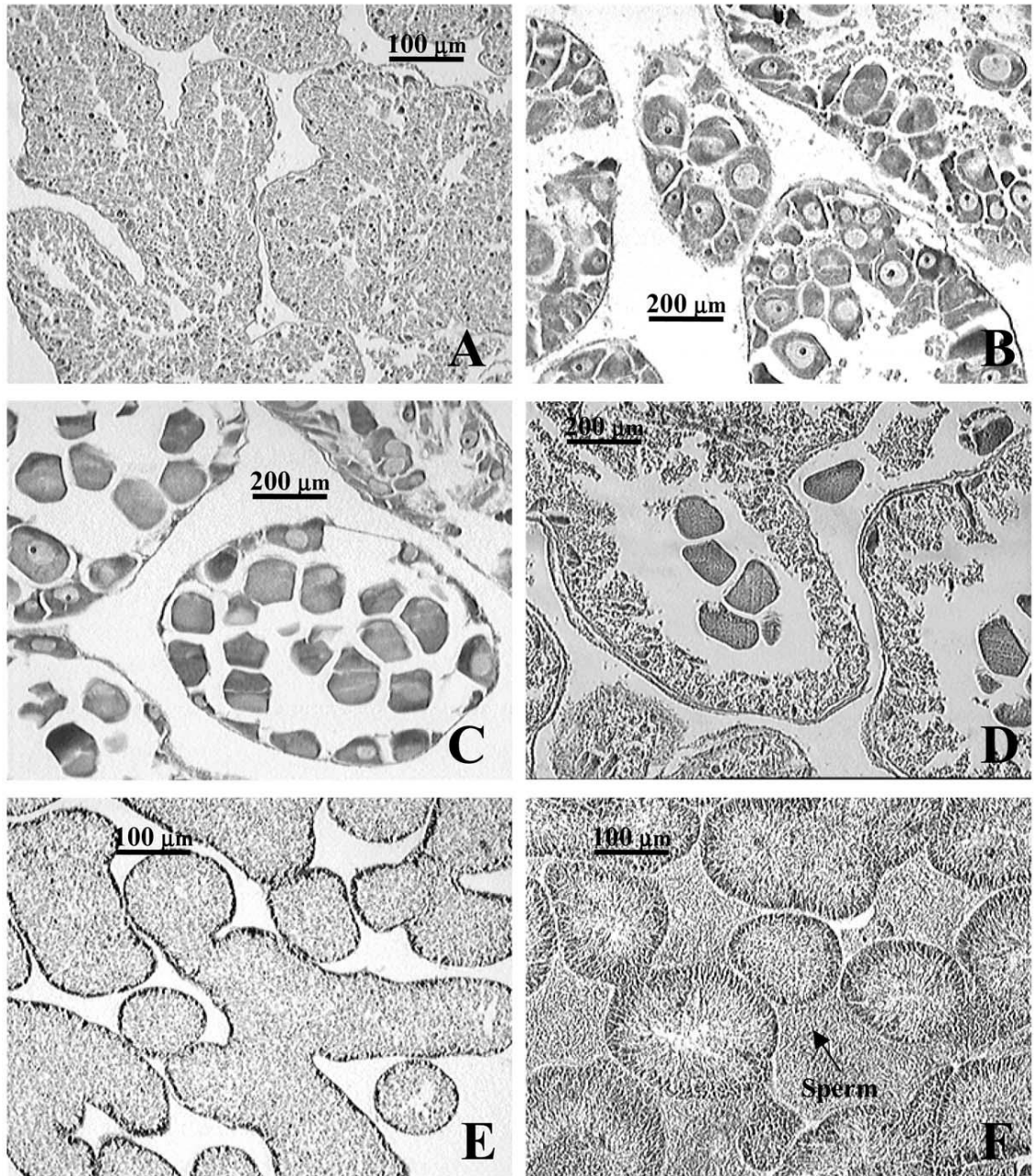
Εικόνα 2.8 Στάδια ωριμότητας των γονάδων των αρσενικών ατόμων του *P. lividus* (Μοντέλο 6 σταδίων για τα αρσενικά άτομα). α.,β. Στάδιο Ι, γ. Στάδιο ΙΙ, δ. Στάδιο ΙΙΙ, ε. Στάδιο ΙV, ς. Στάδιο V, ζ. Στάδιο VI (Byrne 1990).







Εικόνα 2.9. Στάδια ωριμότητας του είδους *P. lividus* (μοντέλο 8 σταδίων). Στην αριστερή στήλη εμφανίζονται με τη σειρά τα στάδια ωριμότητας των γονάδων των θηλυκών ατόμων και αντίστοιχα στη δεξιά των αρσενικών (Spirlet et al. 1998).



Εικόνα 2.14. Στάδια ωριμότητας των γονάδων του *P. lividus* (Μοντέλο 4 σταδίων για τα θηλυκά και 2 για τα αρσενικά). Θηλυκά: Α. στάδιο H1: κενές γονάδες, Β. στάδιο H2: ωρίμανση ωοκυττάρων, C. στάδιο H3: ώριμα ωοκύτταρα, D. στάδιο H4: στάδιο αναδιοργάνωσης των γονάδων με το μέγιστο πάχος του θρεπτικού υλικού. Αρσενικά: Ε. στάδιο M0: κενές γονάδες, F. στάδιο M1: ώριμες γονάδες με παρουσία σπέρματος (Sachez – Espana et al., 2004).

2.7 Δείκτης Ωριμότητας (MI)

Μετά από τον προσδιορισμό των σταδίων ωριμότητας των γονάδων μέσα από την ιστολογική ανάλυση, ακολούθησε ο υπολογισμός του δείκτη ωριμότητας των ατόμων, σύμφωνα με τους Spirlet et al. (1998, 2001).

$$MI = \sum_1^n \frac{MS * n_{MS}}{n_{tot}}$$

Όπου:

n, ο συνολικός αριθμός των σταδίων ωριμότητας (στην παρούσα μελέτη 5 για τα θηλυκά άτομα και 4 για τα αρσενικά).

MS, το στάδιο ωριμότητας (στην παρούσα μελέτη παίρνει τιμές από 1-5 για τα θηλυκά άτομα και από 1-4 για τα αρσενικά)

n_{MS} , ο αριθμός των ατόμων που βρίσκονται στο συγκεκριμένο στάδιο

n_{tot} , ο συνολικός αριθμός των ατόμων που συλλέχθηκαν

Ο Δείκτης Ωριμότητας (MI), είναι ουσιαστικά ο αριθμητικός μέσος του συνόλου των σταδίων ωριμότητας που παρατηρήθηκαν στον υπό μελέτη πληθυσμό (Grosjean 2001), ενώ αποτελεί μία ποσοτική μέθοδο για την τεκμηρίωση των διαφόρων σταδίων ωριμότητας που καταγράφονται σε μία περίοδο μελέτης (Vaitilingon et al. 2005).

2.8 Στατιστική Επεξεργασία

Για τη σύγκριση στο χρόνο των βιομετρικών παραμέτρων (ολικό νωπό βάρος σώματος και νωπό βάρος γονάδων) εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης κατά παράγοντα (one - way ANOVA), ενώ για τον έλεγχο της ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών στη βιομετρία μεταξύ των φύλων αλλά και μεταξύ των δύο

περιοχών, εφαρμόστηκε το κριτήριο t. Η πιθανή απόκλιση της αναλογίας φύλου από τη σχέση 1:1 ελέγχθηκε με το κριτήριο χ^2 (Zar 1996).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Θερμοκρασία

Η μέτρηση της θερμοκρασίας αποτέλεσε σημαντικό τμήμα των δειγματοληψιών, καθώς επηρεάζει άμεσα τη συμπεριφορά και την ωογένεση του είδους (Spirlet et al. 2000).

Για τον σταθμό του Αγ. Στεφάνου η θερμοκρασία σημείωσε τη χαμηλότερη τιμή (13,28°C) κατά τον μήνα Μάρτιο του 2010 , τη μέγιστη τιμή (27,67°C) το Σεπτέμβριο του 2010. Η μέση τιμή της θερμοκρασίας και για τους 24 μήνες των δειγματοληψιών ήταν 19,85°C

Αντίστοιχα στην Κάτω Γατζέα, η θερμοκρασία εμφάνισε την χαμηλότερη της τιμή (13,17°C) κατά το Φεβρουάριο του 2010, τη μέγιστη τιμή (27,18°C) τον Αύγουστο του 2009.η μέση τιμή για την περιοχή και για τα 2 χρόνια ήταν 19,95°C.

Αναλυτικά οι θερμοκρασίες που καταγράφηκαν σε κάθε δειγματοληψία και σε κάθε περιοχή παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Μηνιαίες τιμές θερμοκρασίας για τους δύο σταθμούς.				
Δειγματοληψίες		Μηνιαίες τιμές θερμοκρασίας (°C)		
Έτος	Μήνας	Αγ. Στέφανος	Κάτω Γατζέα	Μέση τιμή
2008	Δεκέμβριος	15,02	15,34	15,18
2009	Ιανουάριος	13,96	14,08	14,02
2009	Φεβρουάριος	13,99		13,99
2009	Μάρτιος	13,31	13,52	13,42
2009	Απρίλιος	16,13	15,92	16,03
2009	Μάιος	21,13	20,68	20,91
2009	Ιούνιος	25,05	24,76	24,91
2009	Ιούλιος	27,08	26,97	27,03
2009	Αύγουστος	27,21	27,18	27,20
2009	Σεπτέμβριος	24,28	23,87	24,08
2009	Οκτώβριος	21,78	21,27	21,53
2009	Νοέμβριος	18,57	18,55	18,56
2009	Δεκέμβριος	16,01	15,64	15,83
2010	Ιανουάριος		13,19	13,19
2010	Φεβρουάριος	13,96	13,17	13,57
2010	Μάρτιος	13,28	13,53	13,41
2010	Απρίλιος	13,30	15,94	14,62
2010	Μάιος	15,34	19,92	17,63
2010	Ιούνιος	21,20	26,45	23,82
2010	Ιούλιος	25,04	27,12	26,08
2010	Αύγουστος	27,08	26,78	26,93
2010	Σεπτέμβριος	27,67	25,03	26,35
2010	Οκτώβριος	24,28	22,04	23,16
2010	Νοέμβριος	21,79	17,95	19,87

3.2 Μορφομετρικές Μετρήσεις

Στον Αγ. Στέφανο, η μέση τιμή του ολικού βάρους σώματος υπολογίστηκε σε $62,00 \pm 23,42$ g. Η ελάχιστη τιμή (13,15 g), βρέθηκε τον Ιανουάριο του 2009 και η μέγιστη (142,96 g) το Μάρτιο του ίδιου έτους. Η μέση τιμή του βάρους των γονάδων, υπολογίστηκε σε $2,619 \pm 2,331$ g, με εύρος από 7,25 g τον Ιανουάριο του 2009 έως 14,81 g το Φεβρουάριο του 2010. Ο GSI, κατά μέσο όρο είχε τιμή $3,91 \pm 2,75$, με την ελάχιστη τιμή να εμφανίζεται κατά τον Ιανουάριο του 2010 (0,10) και την μέγιστη τον Απρίλιο του ίδιου έτους (19,02).

Αντίστοιχα στην Κάτω Γατζέα, η μέση τιμή του ολικού βάρους σώματος υπολογίστηκε σε $62,82 \pm 21,95$ g. Η ελάχιστη τιμή (9,98 g), βρέθηκε τον Δεκέμβριο του 2009, και η μέγιστη (153,83 g) τον Ιανουάριο του ίδιου έτους. Η μέση τιμή του βάρους των γονάδων, υπολογίστηκε σε $2,786 \pm 1,93$ g, με εύρος από 0,001 g το Δεκέμβριο του 2008 έως 11,533 g το Μάρτιο του 2010. Ο GSI, κατά μέσο όρο είχε τιμή $4,29 \pm 2,45$, με τη μέγιστη τιμή να εμφανίζεται κατά το Δεκέμβριο του 2008 (0,01) και τη μέγιστη κατά το Μάρτιο του 2009 (24,99).

Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μορφομετρικές μετρήσεις για τον κάθε σταθμό δειγματοληψίας.

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μορφομετρικών μετρήσεων για τους δύο πληθυσμούς, * $P < 0,05$

Άγιος Στέφανος			
	Ολικό βάρος σώματος (g)	Βάρος γονάδων (g)	GSI
Ελάχιστη τιμή	13,15	7,25	0,10
Μέση τιμή	$62 \pm 23,42$	$2,619 \pm 2,33$	$3,91 \pm 2,75$
Μέγιστη τιμή	142,96	14,808	19,02
ANOVA	$F = 8,58^*$	$F = 29,25^*$	$F = 42,52^*$
Κάτω Γατζέα			
	Ολικό βάρος σώματος (g)	Βάρος γονάδων (g)	GSI
Ελάχιστη τιμή	9,98	0,001	0,01
Μέση τιμή	$62,82 \pm 21,95$	$2,786 \pm 1,93$	$4,29 \pm 2,45$
Μέγιστη τιμή	153,83	11,533	24,99
ANOVA	$F = 13,21^*$	$F = 22,28^*$	$F = 28,48^*$

Η στατιστική επεξεργασία, έδειξε πως και στις δυο περιοχές, τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (ολικό νωπό βάρος σώματος & νωπό βάρος γονάδων) διέφεραν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δειγματοληψίες. Κάτι που ήταν αναμενόμενο, εφόσον τόσο το σωματικό βάρος όσο και το βάρος των γονάδων διαφοροποιείται χρονικά αφού εξαρτώνται από διάφορους περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα τροφής.

Η σύγκριση μεταξύ των δύο πληθυσμών, ως προς το ολικό βάρος σώματος, έδειξε πως οι δύο σταθμοί δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p > 0,05$). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη σύγκριση των δύο σταθμών ως προς το βάρος των γονάδων. Συγκεκριμένα η ανάλυση έδειξε πως οι δύο σταθμοί δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους με το $p > 0,05$. Ωστόσο, ως προς τον γοναδοσωματικό δείκτη, οι δύο πληθυσμοί φαίνεται πως διαφοροποιούνται ($p < 0,05$).

Εφόσον δεν εμφανίστηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο περιοχών ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν, οι δύο πληθυσμοί

μπορούν να χαρακτηριστούν ως ένα ενιαίο απόθεμα, ως προς τους παραπάνω χαρακτήρες, αντιπροσωπευτικό του Παγασητικού κόλπου.

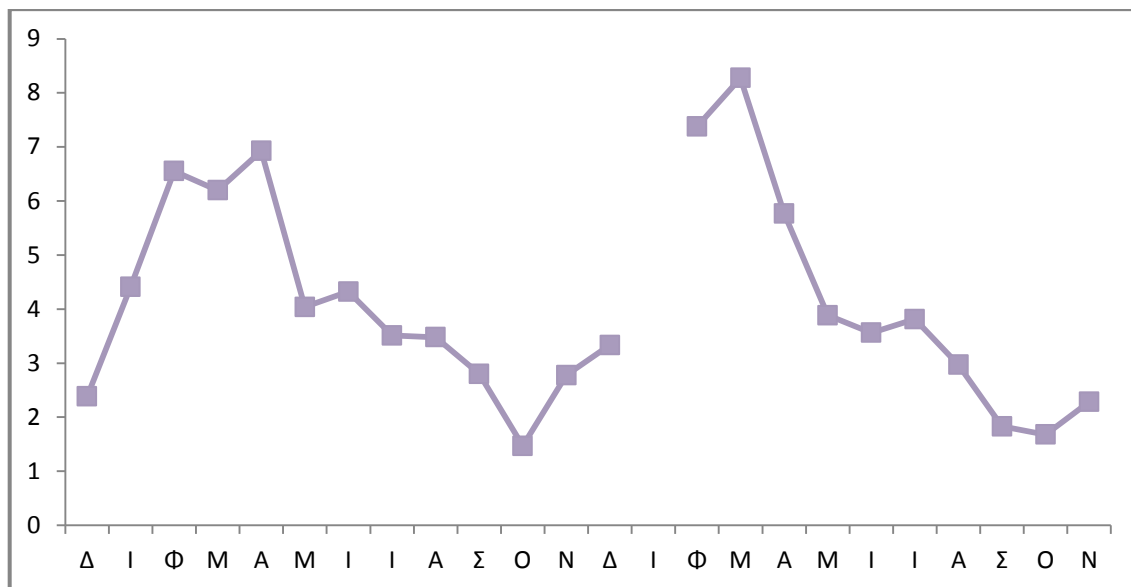
Η διαφοροποίηση του γοναδοσωματικού δείκτη, ίσως να οφείλεται σε μεμονωμένους μήνες δειγματοληψιών και πιθανόν να μπορεί να ερμηνευτεί μέσω της προσαρμοστικότητας που εμφανίζει το είδος στις ιδιαιτερότητες του κάθε ενδιαίτηματος.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως τον Φεβρουάριο του 2009, δεν πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στην Κάτω Γατζέα, όπως και τον Ιανουάριο του 2010 στον Αγ. Στέφανο, λόγω κακών καιρικών συνθηκών, που δεν επέτρεψαν την ασφαλή κατάδυση των δυτών.

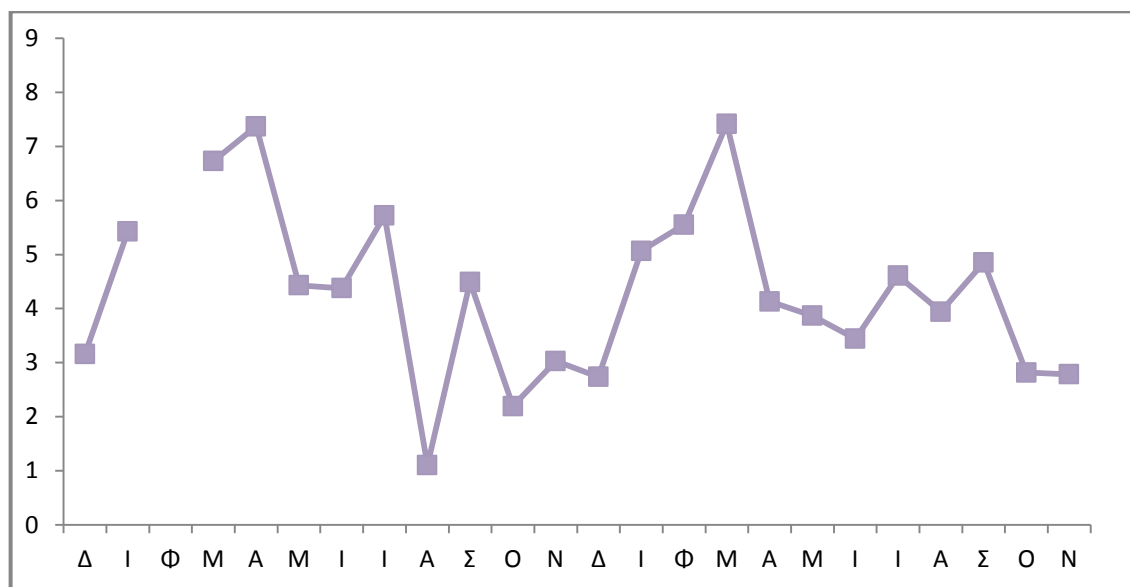
Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται η πορεία, στο χρόνο, του γοναδοσωματικού δείκτη για το σταθμό του Αγ. Στέφανου. Όπως φαίνεται ο GSI, εμφανίζει δύο κορυφές που ακολουθούνται από απότομη πτώση κατά το έτος 2009. Η πρώτη εμφανίζεται κατά τους μήνες Απρίλιο – Μάιο και η δεύτερη κατά τους Δεκέμβριο – Ιανουάριο. Κατά το έτος 2010 μία κορυφή εμφανίζεται τον Μάρτιο και στη συνέχεια πτώση, μέχρι το μήνα Μάιο, ενώ το μήνα Νοέμβριο εμφανίζει ξανά μία αυξητική τάση, της οποίας όμως την πορεία δεν είναι δυνατό να γνωρίζουμε, αφού τα δεδομένα σταματούν σε εκείνο το μήνα.

Η πορεία του γοναδοσωματικού δείκτη στην περιοχή της Κάτω Γατζέας, απεικονίζονται γραφικά στο Σχήμα 3.2. Όπως φαίνεται η καμπύλη του δείκτη εμφανίζει εντονότερες αυξομειώσεις συγκριτικά με τον Αγ. Στέφανο με τρεις κορυφές κατά το 2009 και δύο κατά το 2010. Το 2009 η πρώτη πτώση του δείκτη εμφανίζεται κατά τους μήνες Απρίλιο με Ιούνιο και ακολουθείται από μια δεύτερη κατά τους Ιούλιο – Αύγουστο, ενώ η τρίτη πτώση εμφανίζεται κατά τους Σεπτέμβριο – Οκτώβριο. Κατά το

2010 εμφανίζεται μία πτώση κατά τους μήνες Μάρτιο – Ιούνιο και μία δεύτερη κατά τους Σεπτέμβριο – Οκτώβριο.



Σχήμα 3.1. Πορεία του δείκτη GSI για το σταθμό του Αγ. Στέφανου από το Δεκέμβριο του 2008 έως και το Νοέμβριο του 2010.



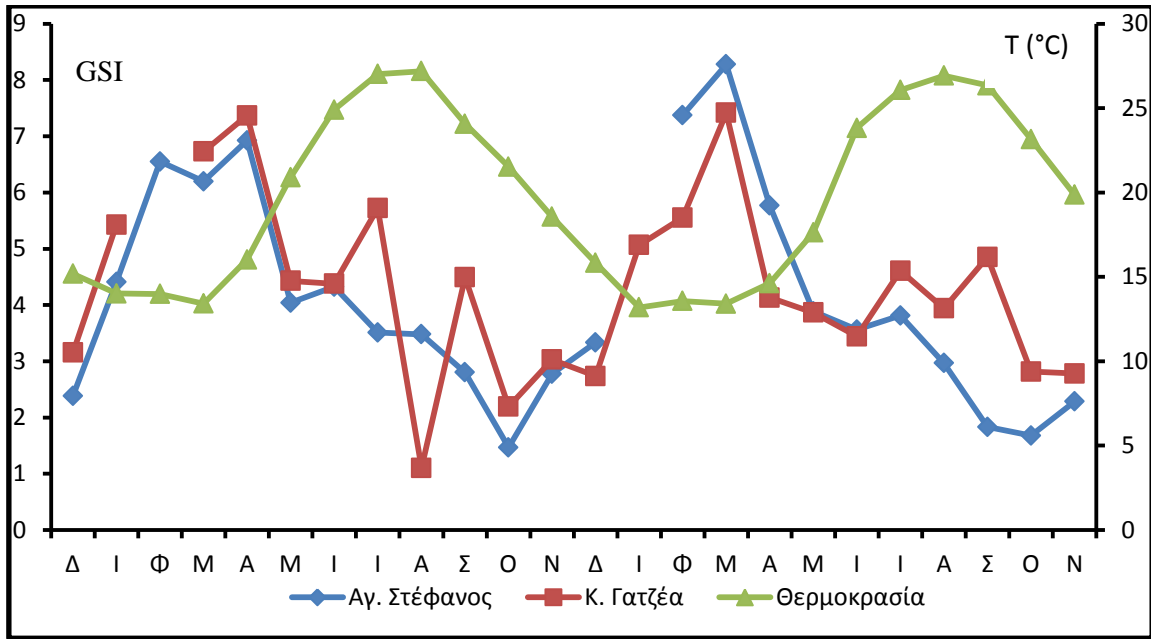
Σχήμα 3.2. Πορεία του δείκτη GSI για το σταθμό της Κάτω Γατζέας από το Δεκέμβριο του 2008 έως και το Νοέμβριο του 2010.

Αυτές οι αυξομειώσεις του δείκτη θα μπορούσαν λανθασμένα να ερμηνευτούν ως ενδεχόμενα αναπαραγωγικά συμβάντα. Κάνοντας αυτή την παραδοχή θα έπρεπε να

δεχθούμε πως ο πληθυσμός του Αγ. Στεφάνου έχει δύο περιόδους αναπαραγωγής ενώ ο πληθυσμός της Κάτω Γατζέας τρεις.

Βέβαια όπως έχει αναφερθεί η εξέταση του γοναδοσωματικού δείκτη δε δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα όσο αφορά τις περιόδους αναπαραγωγής των εχινοειδών. Για το λόγο αυτό δεν είναι δυνατό να εξαχθούν ακριβή και αξιόπιστα συμπεράσματα για τις περιόδους αναπαραγωγής του είδους χρησιμοποιώντας μόνο τα αποτελέσματα του δείκτη, παρά μόνο αν τεκμηριωθούν και με τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης.

Ο γοναδοσωματικός δείκτης συσχετίστηκε με τη θερμοκρασία και εμφάνισε αρνητική συσχέτιση και στις δύο περιοχές με την τιμή του δείκτη να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και να αυξάνεται με τη μείωση της (Σχ. 3.3). Παρόμοια συμπεριφορά του δείκτη έχουν αναδείξει και άλλες μελέτες (Sanchez – Espana et al. 2004, Shpigel et al. 2004), με τον GSI να παίρνει τις υψηλότερες τιμές κατά τους χειμερινούς μήνες που εμφανίζονται οι χαμηλότερες θερμοκρασίες και τις χαμηλότερες κατά τους καλοκαιρινούς αντίστοιχα.

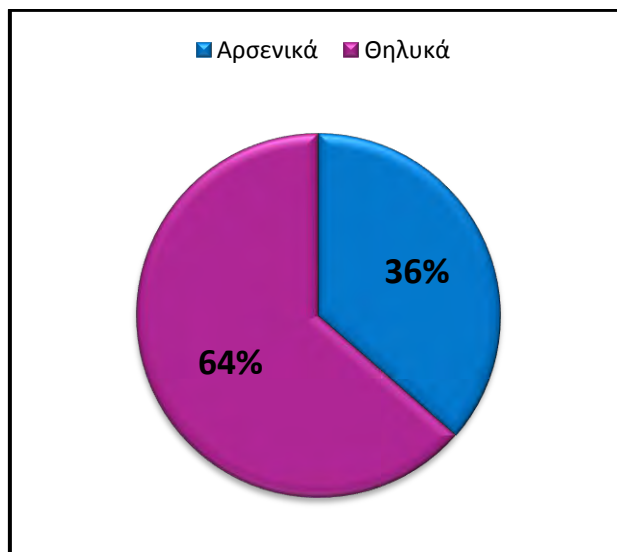


Σχήμα 3.3 Συσχέτιση θερμοκρασίας με το γοναδοσωματικό δείκτη για την κάθε περιοχή δειγματοληψίας από το Δεκέμβριο του 2008 έως το Νοέμβριο του 2010.

3.3 Ιστολογική Ανάλυση

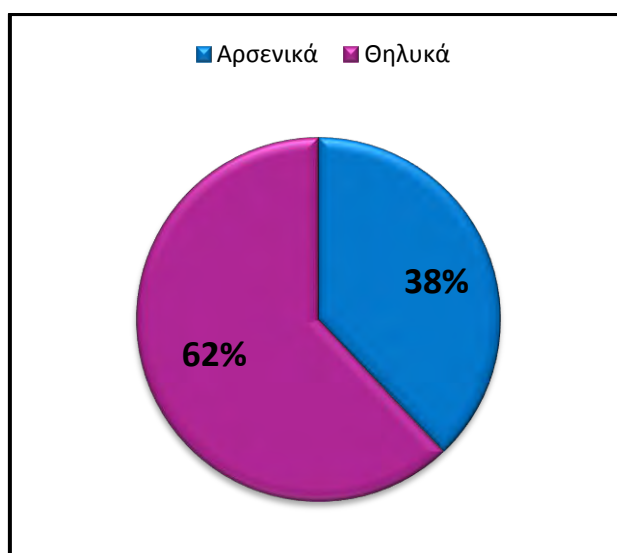
3.3.1 Αναλογία φύλων

Μετά από την ταυτοποίηση του φύλου των ιστολογικών παρασκευασμάτων, από τα 764 άτομα που συλλέχθηκαν από τον Αγ. Στέφανο, τα 278 βρέθηκαν αρσενικά και τα 486 θηλυκά. Η αναλογία θηλυκών : αρσενικών ατόμων στον Αγ. Στέφανο υπολογίστηκε σε 1,75:1 ($\chi^2 > 3,84$), με κυριαρχία των θηλυκών ατόμων (Σχ. 3.4).



Σχήμα 3.4 Σχηματική απεικόνιση αναλογίας αρσενικών:θηλυκών ατόμων για την περιοχή του Αγ. Στεφάνου.

Αντίστοιχα στην Κάτω Γατζέα από τα 757 άτομα που συλλέχθηκαν, τα 287 ήταν αρσενικά και τα 470 θηλυκά. Η αναλογία θηλυκά : αρσενικά άτομα υπολογίστηκε στο 1,64: 1 ($\chi^2 > 3,84$), με κυριαρχία και σε αυτόν τον πληθυσμό των θηλυκών ατόμων (Σχ.3.5).



Σχήμα 3.5 Σχηματική απεικόνιση αναλογίας αρσενικών:θηλυκών ατόμων για την περιοχή της Κάτω Γατζέας.

Στα περισσότερα εχινόδερμα η αναλογία θηλυκών προς αρσενικών ατόμων πλησιάζει τη μονάδα (Lawrence 1987). Στην παρούσα μελέτη τα θηλυκά άτομα βρέθηκε να κυριαρχούν έναντι των αρσενικών και στις δύο περιοχές, με αναλογίες 1,75:1 και 1,64:1. Κάτι τέτοιο ωστόσο, δεν είναι πρωτόγνωρο για τους πληθυσμούς του *P. lividus*, καθώς σε αντίστοιχες μελέτες στο Κεντρικό Αιγαίο (Λόλας 2008) και στη νοτιοδυτική Μεσόγειο (Guettaf et al. 2000), καταγράφηκε κυριαρχία από 1,5:1 μέχρι και 3:1.

Αξίζει να σημειωθεί πως το είδος *S. granularis* έχει εμφανίσει παρόμοια αναλογία (1,5:1), σε πληθυσμό του Αγ. Στεφάνου σε έρευνα που έλαβε χώρα κατά το 2010, σχετικά με τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του είδους στον Παγασητικό κόλπο (Ιωαννίδη 2011).

Σε αρκετές μελέτες, τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τα βιομετρικά χαρακτηριστικά τους (Guettaf et al. 2000, Gago et al. 2003). Παρόλο που στην περιοχή του Αγ. Στεφάνου τα ευρήματα φαίνεται να συμφωνούν με την παραπάνω παραδοχή, στην Κάτω Γατζέα, εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ως προς το ολικό βάρος σώματος ($p < 0,05$), με τα θηλυκά άτομα να εμφανίζονται μεγαλύτερα σε μέγεθος. Ωστόσο, οι διαφορές που εντοπίστηκαν δεν είναι επαρκείς για να στηρίζουν την ύπαρξη φυλετικής μορφολογικής διαφοροποίησης, καθώς οφείλονται σε μεμονωμένους μήνες δειγματοληψιών.

3.3.2 Στάδια ωριμότητας γονάδων

Μετά από παρατήρηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων, ορίστηκαν πέντε στάδια ωριμότητας για τις γονάδες των θηλυκών ατόμων και τέσσερα για των αρσενικών. Αναλυτικότερα για τα θηλυκά άτομα ορίστηκαν τα παρακάτω στάδια:

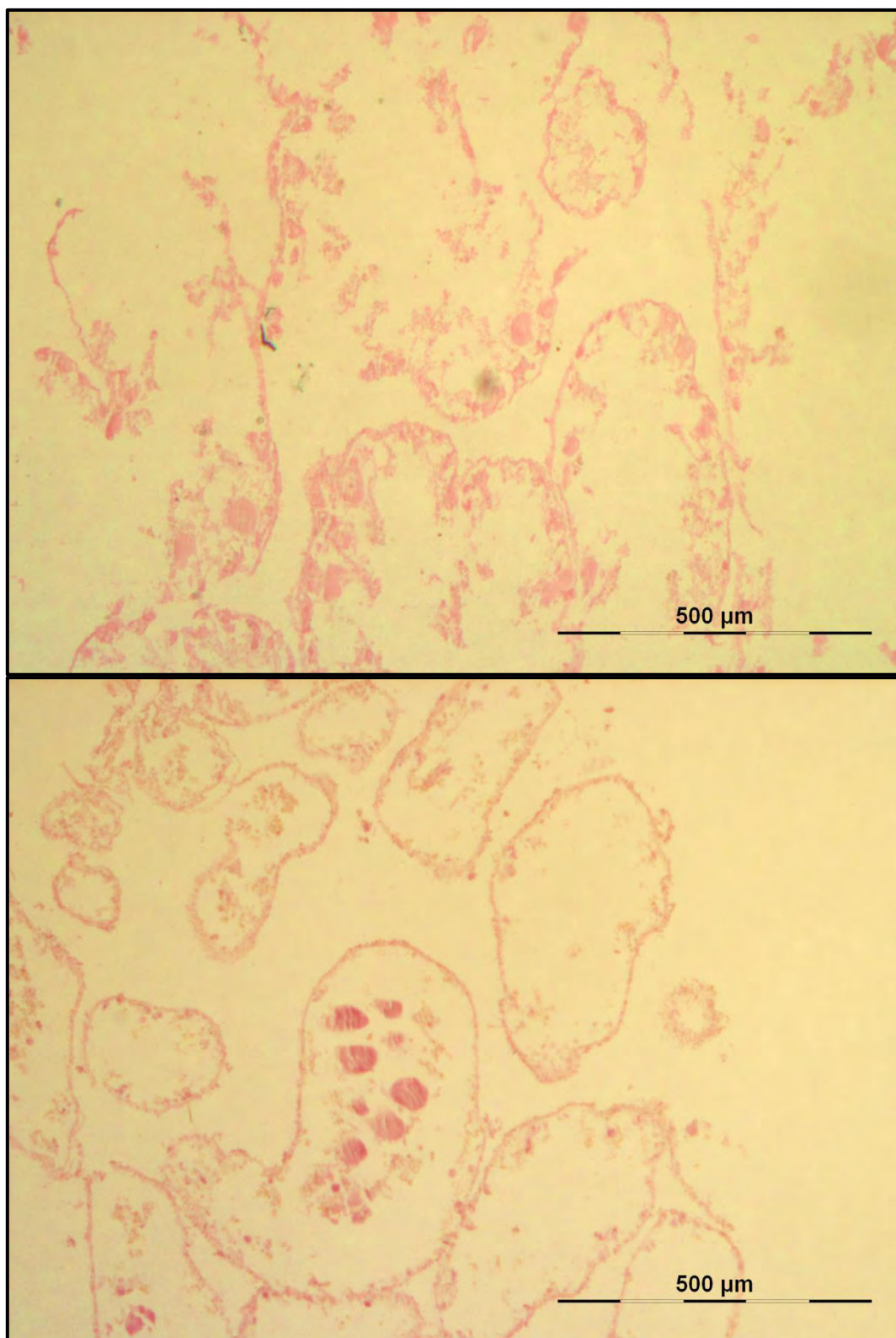
Στάδιο 1: *κενές γονάδες (Εικ. 3.1)*, χρονικά πρόκειται για το στάδιο μετά την αναπαραγωγή. Τα ωοθυλάκια είναι άδεια από ωοκύτταρα, και έχουν αρχίσει να συσσωρεύουν εκ νέου θρεπτικό υλικό για να αρχίσει ένας νέος κύκλος ωογένεσης. Μπορεί να παρατηρηθούν υπολειμματικά ωοκύτταρα τα οποία δεν απελευθερώθηκαν κατά τη διαδικασία της αναπαραγωγής.

Στάδιο 2: *στάδιο αναδιοργάνωσης (Εικ. 3.2)*, τα ωοθυλάκια έχουν γεμίσει με θρεπτικό υλικό και είναι έτοιμα να αρχίσουν το νέο κύκλο δημιουργίας ωοκυττάρων.

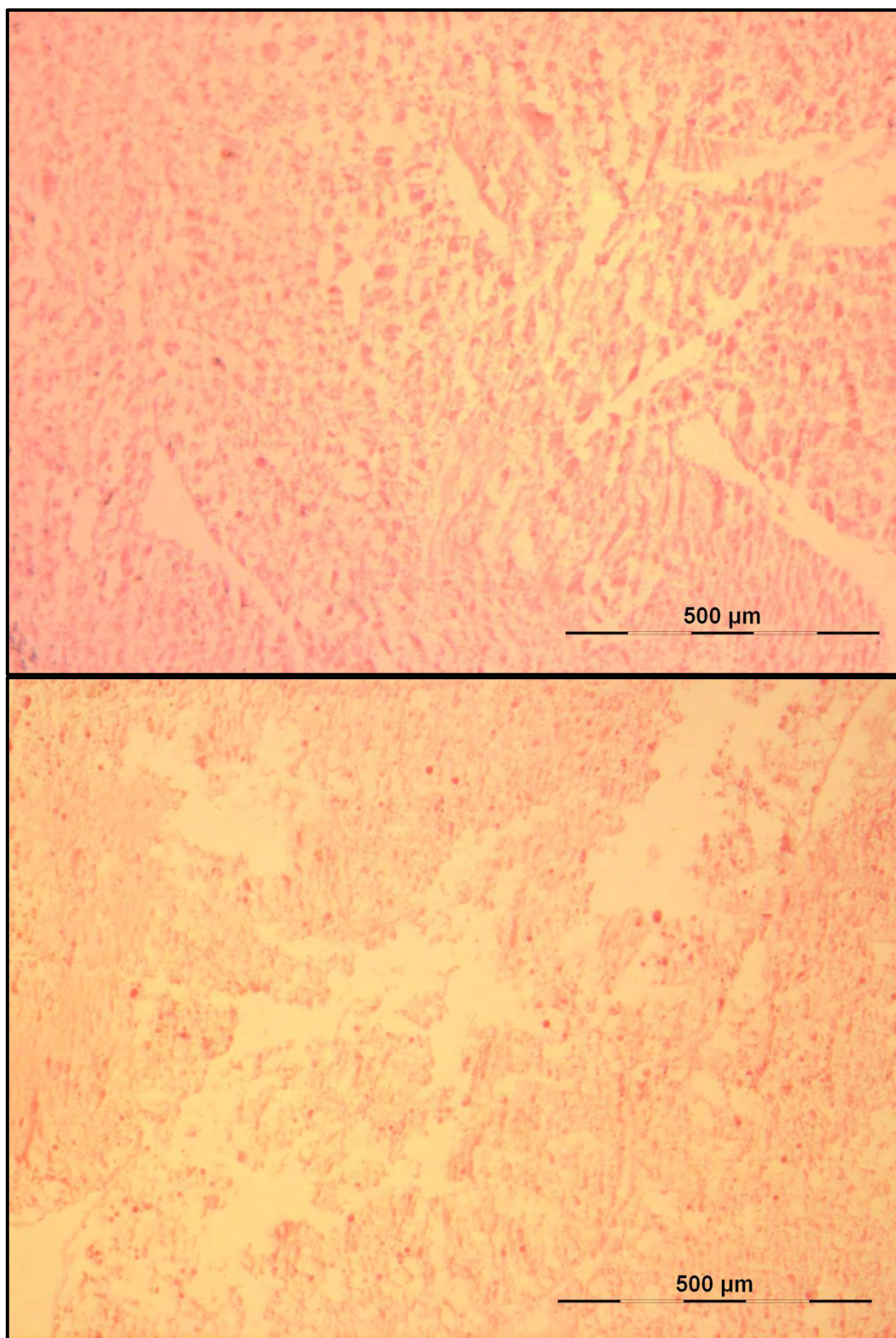
Στάδιο 3: *στάδιο ανάπτυξης (Εικ. 3.3)*, εμφάνιση των πρώιμων ωοκυττάρων με ευδιάκριτους τους πυρήνες στο κέντρο τους, το θρεπτικό υλικό αρχίζει να καταναλώνεται. Σε πρώτη φάση τα πρώιμα αυτά ωοκύτταρα εμφανίζονται στα τοιχώματα των ωοθυλακίων και σε προχωρημένο στάδιο γεμίζουν ολόκληρο το χώρο των ωοθυλακίων καταναλώνοντας όλη την ποσότητα των θρεπτικών υλικών.

Στάδιο 4: *στάδιο ωρίμανσης (Εικ. 3.4)*, εμφανίζονται τα πρώτα ώριμα ωοκύτταρα στο κέντρο των ωοθυλακίων. Τα ωοκύτταρα αν και έχουν πάρει την τελική τους μορφή είναι μικρά σε μέγεθος, λίγα και αραιά διατεταγμένα στο χώρο γύρω από το κέντρο του θυλακίου, ενώ υπάρχουν ακόμα κάποια πρώιμα στα τοιχώματα.

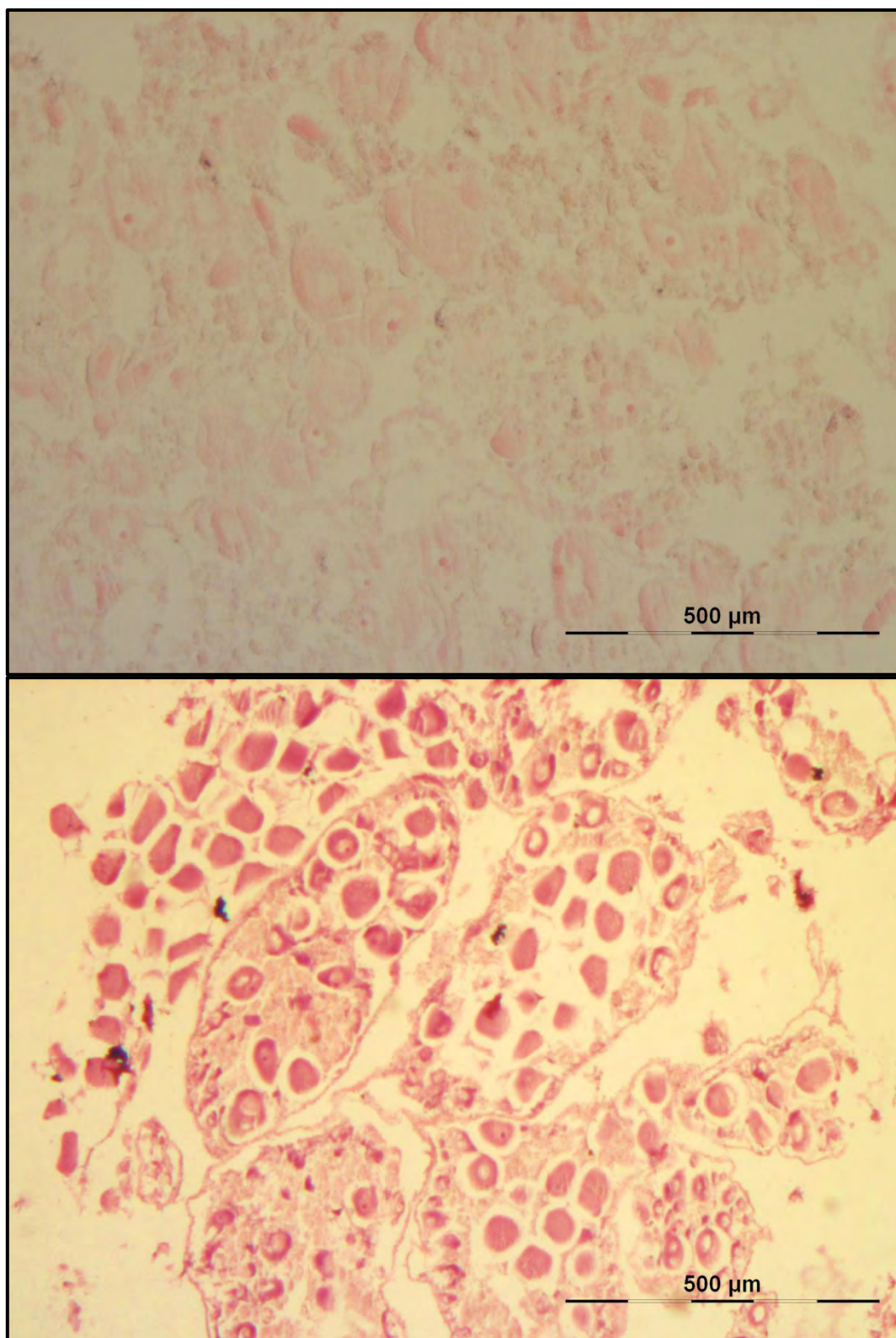
Στάδιο 5: *στάδιο ώριμων ωοκυττάρων (Εικ. 3.5)*, όλα τα ωοκύτταρα έχουν αναπτυχθεί πλήρως και έχουν κατακλύσει όλο το χώρο των ωοθυλακίων. Είναι αρκετά μεγάλα σε μέγεθος και πυκνά διατεταγμένα, έτοιμα να απελευθερωθούν στο περιβάλλον. Τα τοιχώματα των ωοθυλακίων έχουν γίνει αρκετά λεπτά που σχεδόν δε φαίνονται, λόγω της πλήρης αφομοίωσης των θρεπτικών. Χρονικά είναι το στάδιο λίγο πριν η αναπαραγωγική διαδικασία αρχίσει, με απελευθέρωση των ωοκυττάρων στο περιβάλλον.



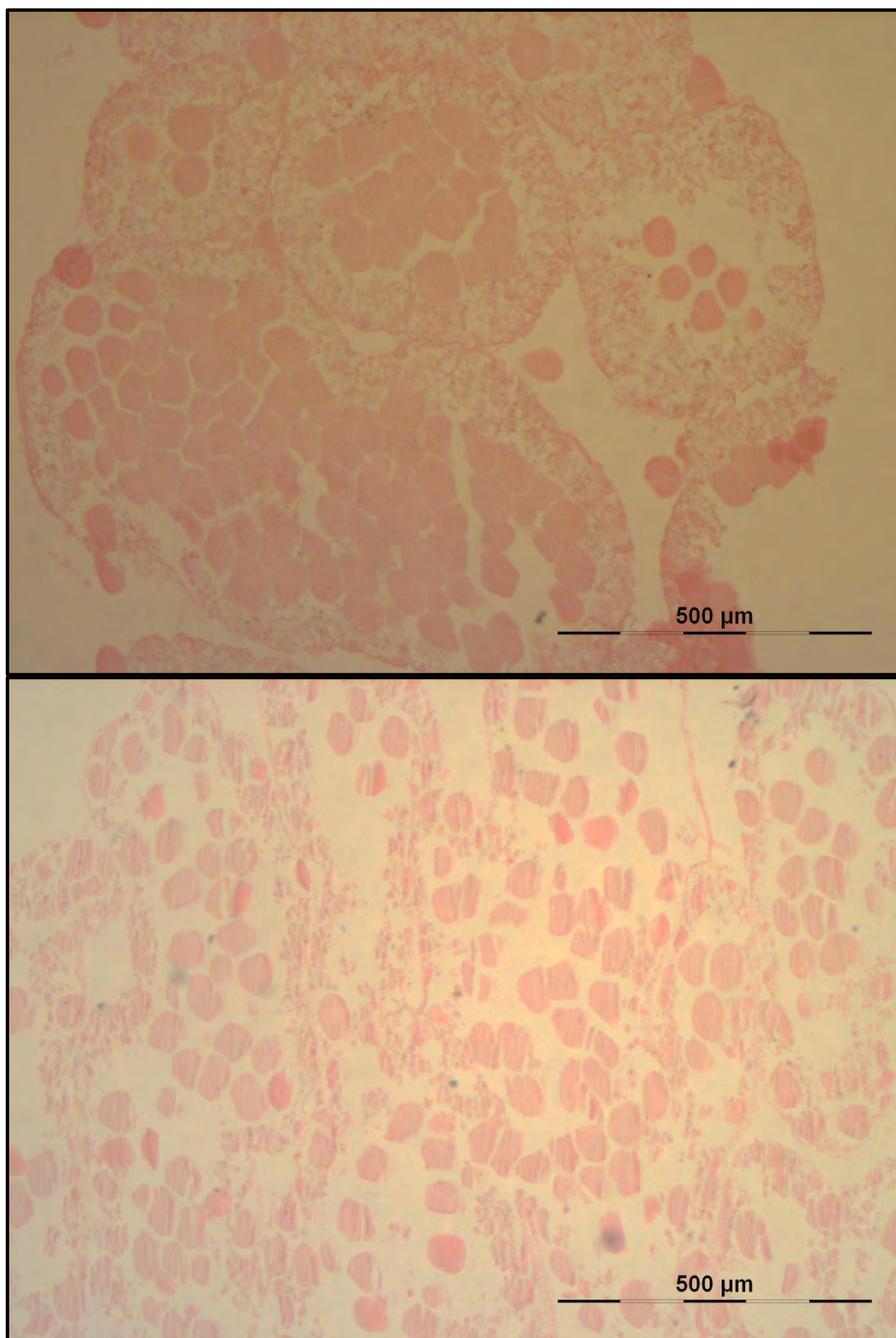
Εικόνα 3.1 Τομές γονάδων θηλυκών απόμων στο στάδιο ωριμότητας 1 (κενές γονάδες).



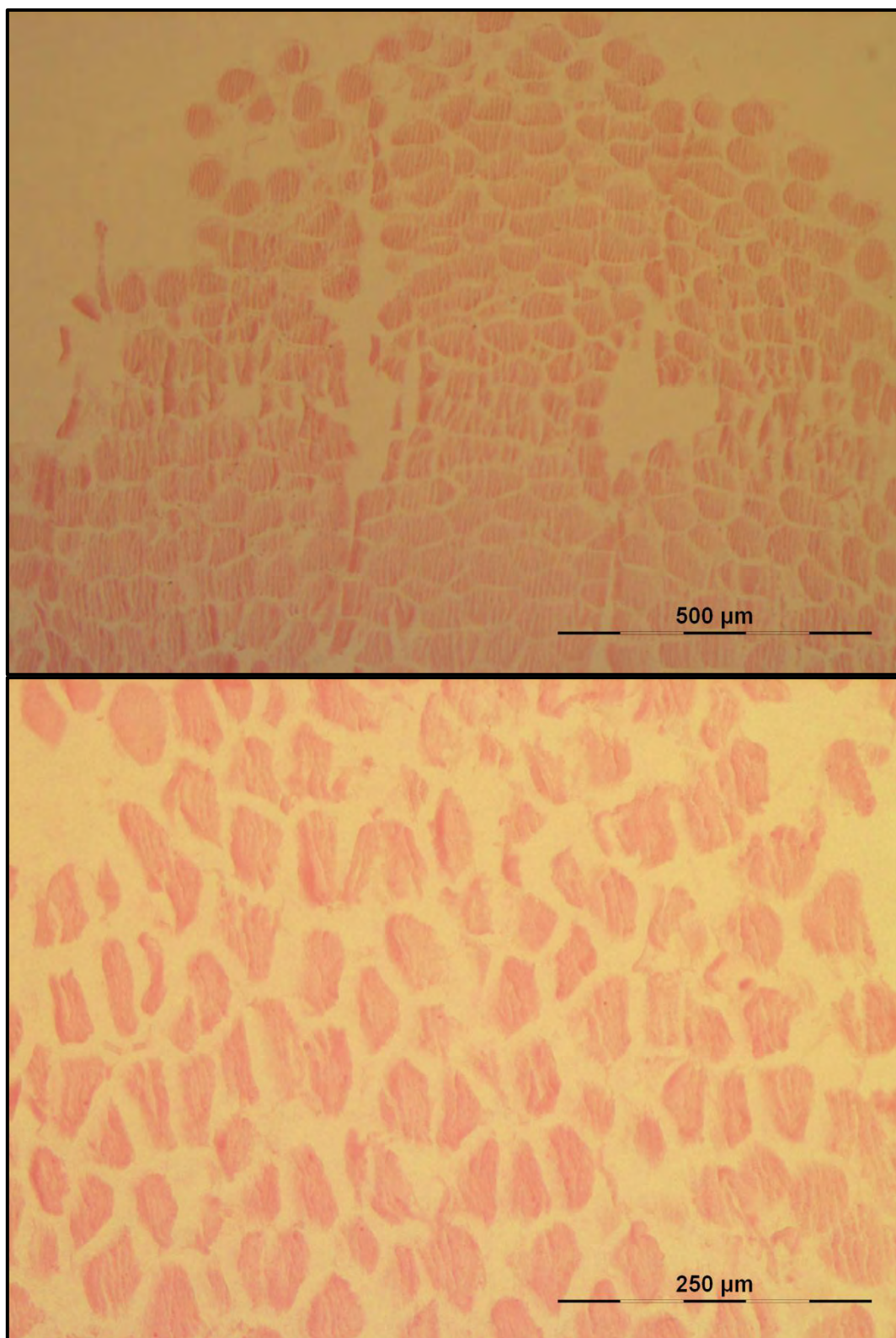
Εικόνα 3.2. Τομές γονάδων θηλυκών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 2 (στάδιο αναδιοργάνωσης).



Εικόνα 3.3. Τομές γονάδων θηλυκών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 3 (στάδιο ανάπτυξης).



Εικόνα 3.4. Τομές γονάδων θηλυκών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 4 (στάδιο ωρίμανσης).



Εικόνα 3.5. Τομές γονάδων θηλυκών απόμων στο στάδιο ωριμότητας 5 (στάδιο ώριμων ωοκυττάρων).

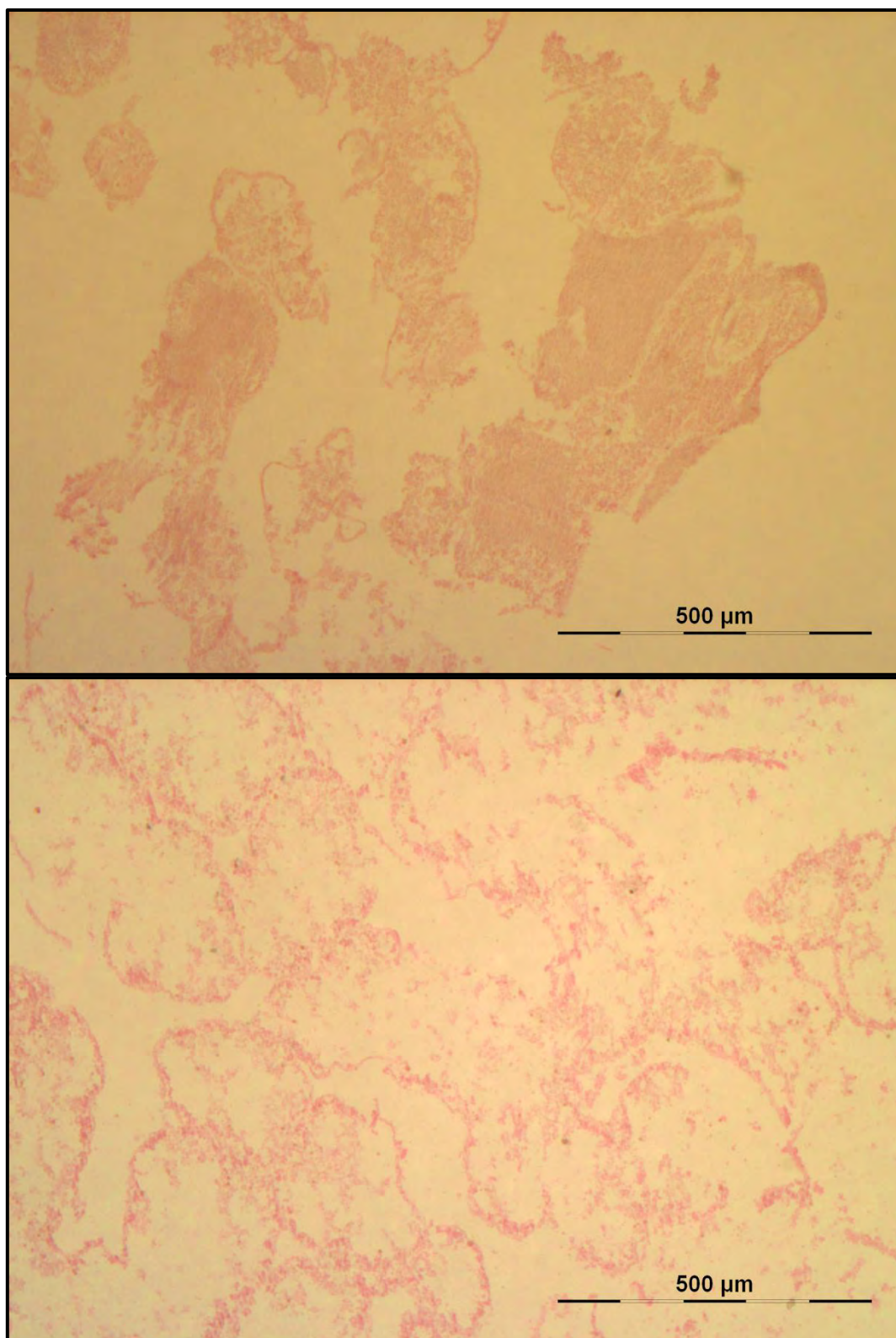
Για τα αρσενικά άτομα ο καθορισμός των σταδίων έγινε ως εξής:

Στάδιο 1: *κενές γονάδες*, οι σπερματοκύστες είναι σχεδόν άδειες και έχει αρχίσει να συσσωρεύεται θρεπτικό υλικό για την αρχή ενός νέου κύκλου γαμετογένεσης. Μπορούν να παρατηρηθούν υπολειμματικά ίχνη σπέρματος, που δεν απελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής. Χρονικά πρόκειται για το στάδιο μετά την αναπαραγωγή.

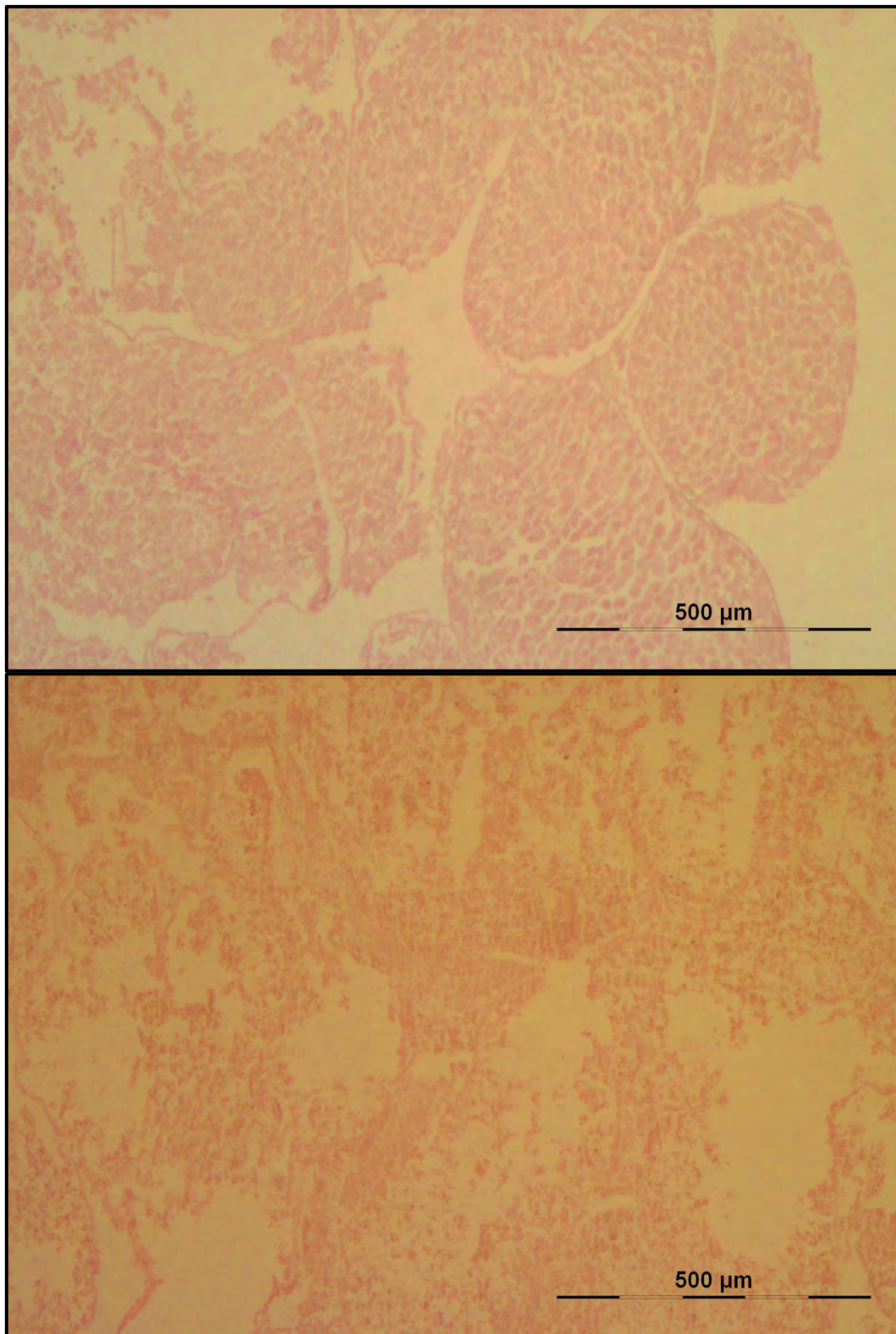
Στάδιο 2: *στάδιο αναδιοργάνωσης*, οι σπερματοκύστες έχουν πληρωθεί με θρεπτικό υλικό και είναι έτοιμες να αρχίσουν τον νέο κύκλο δημιουργίας σπέρματος.

Στάδιο 3: *στάδιο εμφάνισης σπέρματος*, αρχίζει η εμφάνιση του σπέρματος στις σπερματοκύστες. Το θρεπτικό υλικό έχει καταναλωθεί και το σπέρμα αρχίζει να εμφανίζεται από το κέντρο των κύστεων.

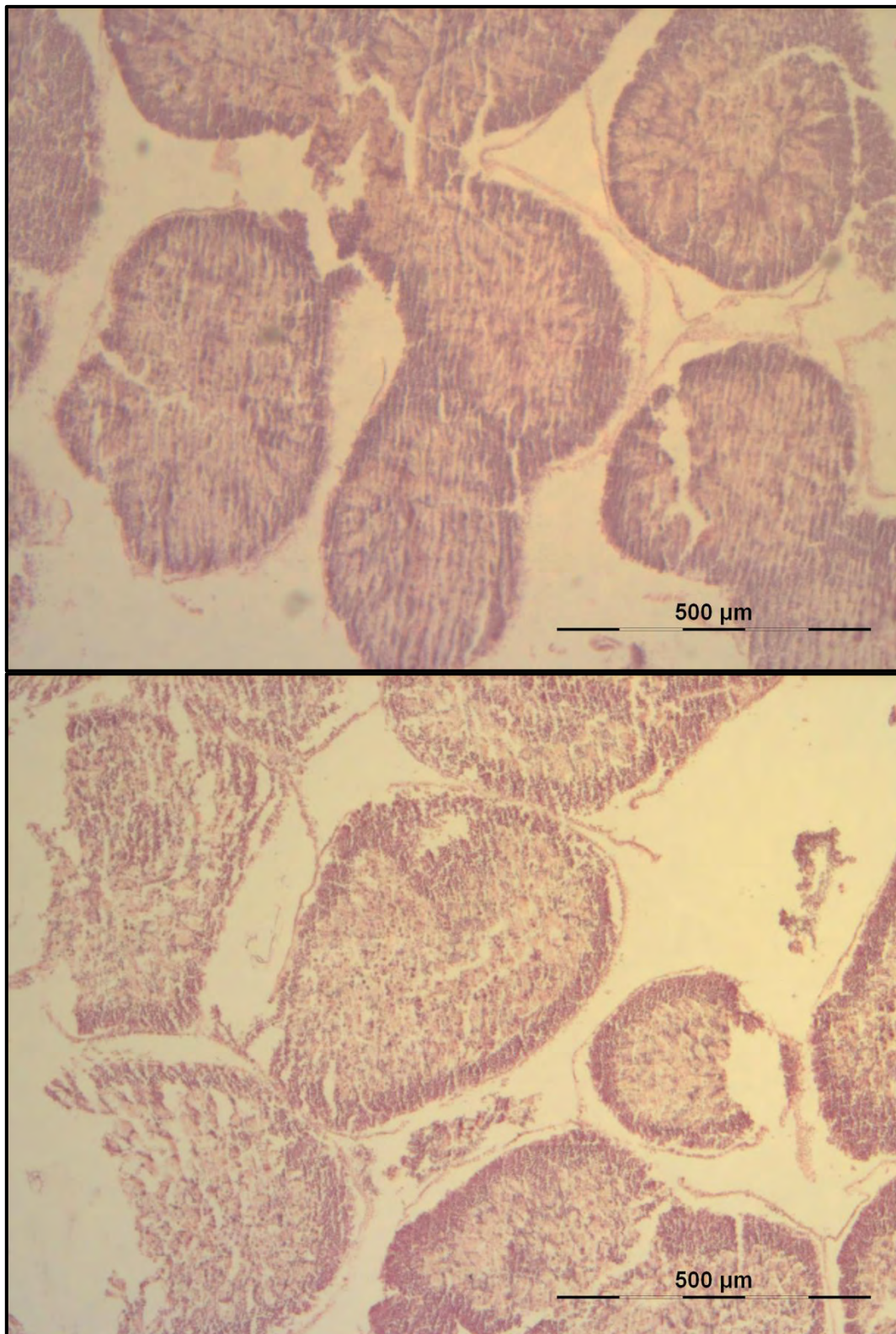
Στάδιο 4: *στάδιο αναπαραγωγής*, το σπέρμα έχει γεμίσει τους όρχεις και σε προχωρημένο στάδιο έχει βγει και έξω από αυτούς καταλαμβάνοντας χώρο στο περιβάλλον των σπερματοκύστεων. Οι γονάδες είναι έτοιμες να απελευθερώσουν τους γαμέτες στο περιβάλλον. Χρονικά είναι το στάδιο λίγο πριν η αναπαραγωγική διαδικασία αρχίσει.



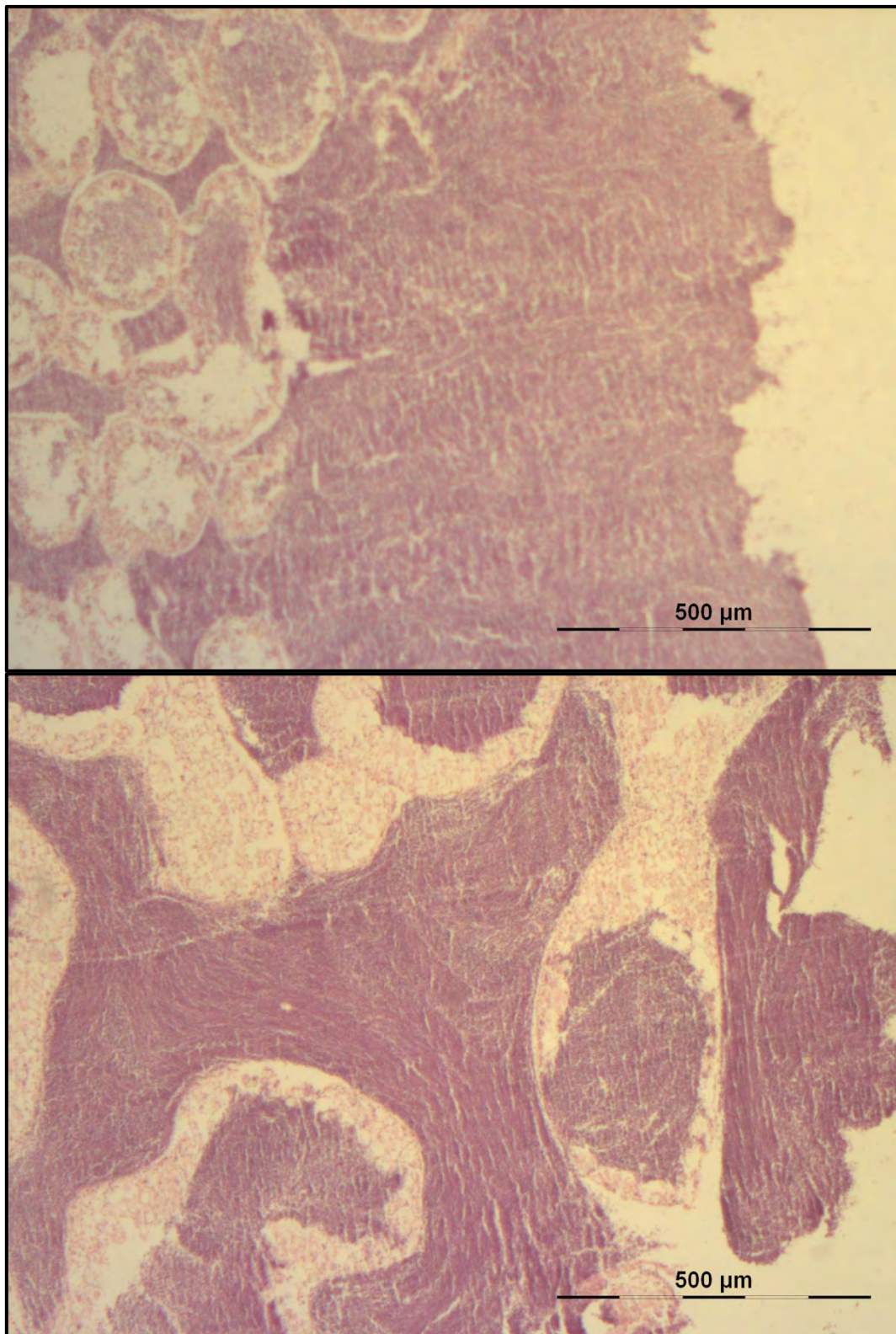
Εικόνα 3.6. Τομές γονάδων αρσενικών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 1 (στάδιο κενών γονάδων)



Εικόνα 3.7. Τομές γονάδων αρσενικών ατόμου στο στάδιο ωριμότητας 2 (στάδιο αναδιοργάνωσης)



Εικόνα 3.8. Τομές γονάδων αρσενικών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 3 (στάδιο εμφάνισης σπέρματος)



Εικόνα 3.9. Τομές γονάδων αρσενικών ατόμων στο στάδιο ωριμότητας 4 (στάδιο αναπαραγωγής)

Η συμμετοχή των σταδίων των θηλυκών ατόμων για την περιοχή του Αγ. Στέφανου, απεικονίζεται γραφικά στο σχήμα 3.4 και είχε ως εξής:

Το στάδιο των κενών γονάδων (στάδιο ωριμότητας 1), εμφανίστηκε στους περισσότερους μήνες και για τα δύο χρόνια, με χαρακτηριστική την απουσία του τον Ιούλιο και των δύο ετών. Το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης παρουσίασε το Μάιο του 2009 όπου και ξεπέρασε το 60% της συμμετοχής και το Νοέμβριο του 2010 με ποσοστό περίπου 40%.

Το στάδιο αναδιοργάνωσης (στάδιο ωριμότητας 2), εμφανίστηκε σε όλους τους μήνες των δειγματοληψιών εκτός από το Μάρτιο του 2009. Κατά τον Ιούλιο και των δύο χρόνων κατείχε το 100% της συμμετοχής των σταδίων, με τον Αύγουστο να ακολουθεί με περίπου 90% και για τα δύο χρόνια.

Το στάδιο ανάπτυξης (στάδιο ωριμότητας 3), εμφανίστηκε σε αρκετούς μήνες και τα δύο χρόνια με μεγαλύτερα ποσοστά συμμετοχής να εμφανίζει το Σεπτέμβριο και των δύο χρόνων με ποσοστό 51,8% το 2009 και 59,2% το 2010.

Το στάδιο ωρίμανσης (στάδιο ωριμότητας 4), εμφανίστηκε σε αρκετούς μήνες με απουσία κατά τους Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο και για τα δύο χρόνια. Μεγαλύτερα ποσοστά συμμετοχής εμφανίστηκαν κατά τον Μάρτιο και για τα δύο χρόνια με 48% συμμετοχή το 2009 και 62,5% το 2010.

Τέλος το στάδιο των ώριμων ωοκυττάρων (στάδιο ωριμότητας 5), το 2009 εμφανίστηκε σε μικρά ποσοστά μέχρι 18,7% κατά τους Μάρτιο – Απρίλιο και Οκτώβριο – Νοέμβριο 2009 και Φεβρουάριο – Μάρτιο, Μάιο και Οκτώβριο 2010.

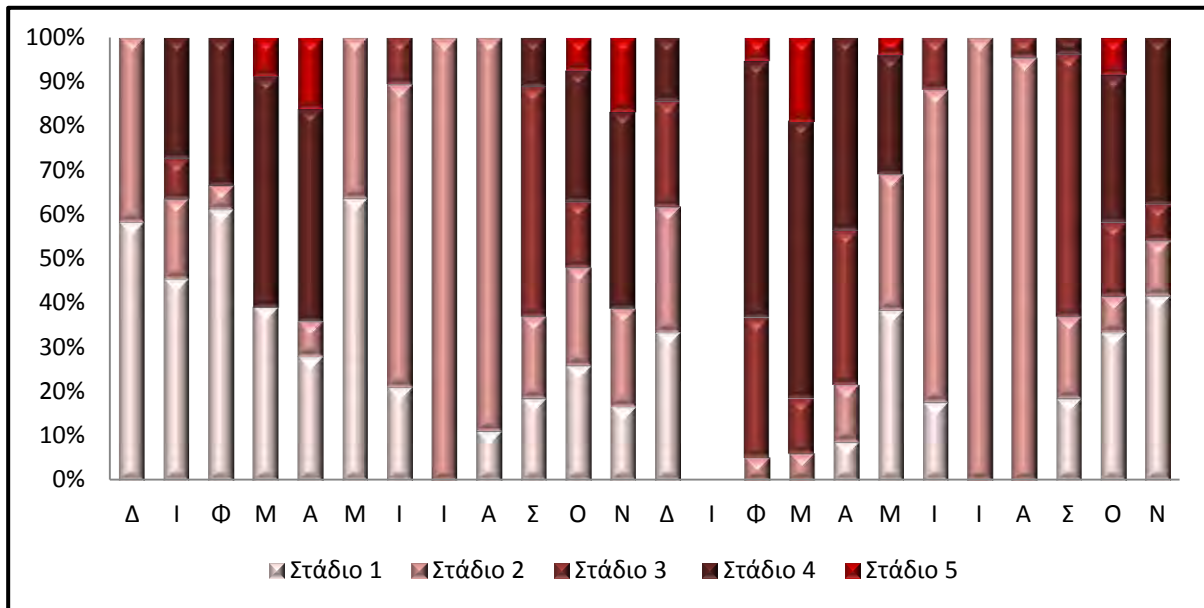
Η συμμετοχή των σταδίων των αρσενικών ατόμων για την περιοχή του Αγ. Στέφανου, απεικονίζεται γραφικά στο σχήμα 3.5 και είχε ως εξής:

Το στάδιο των κενών γονάδων (στάδιο ωριμότητας 1), εμφανίστηκε σχεδόν σε όλους τους μήνες με μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής στην κατανομή κατά τον Ιανουάριο του 2009 που εμφανίστηκε ως κυρίαρχο στάδιο (100%), ενώ το 2010 το μεγαλύτερο ποσοστό που εμφάνισε ήταν μόλις το 20% κατά τον Ιούλιο του 2010.

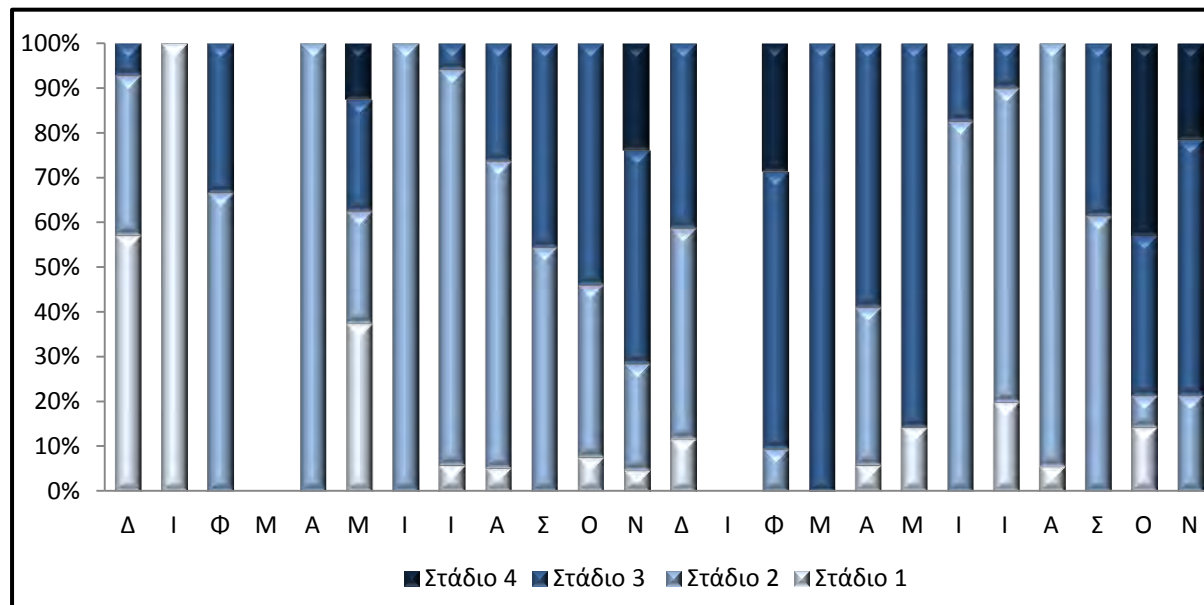
Το στάδιο αναδιοργάνωσης (στάδιο ωριμότητας 2), εμφανίστηκε και αυτό σχεδόν σε όλους τους μήνες, εκτός από τον Ιανουάριο του 2009 και τους Μάρτιο και Μάιο του 2010. Κατείχε το 100% του συνόλου των αρσενικών ατόμων τον Απρίλιο και τον Ιούνιο του 2009 ενώ το 2010 τα μεγαλύτερα ποσοστά που εμφάνισε ήταν το 94,4% κατά τον Αύγουστο και το 82,6% τον Ιούνιο.

Το στάδιο της εμφάνισης σπέρματος (στάδιο ωριμότητας 3), εμφανίστηκε σχεδόν σε όλες τις δειγματοληψίες εκτός από του μήνες Ιανουάριο, Απρίλιο και Ιούνιος του 2009 και Αύγουστο του 2010. Το μέγιστο ποσοστό του εμφανίστηκε τον Μάρτιο του 2010 (100%).

Το στάδιο της αναπαραγωγής (στάδιο ωριμότητας 4), εμφανίστηκε σε περιορισμένους μήνες και για τα δύο χρόνια. Συγκεκριμένα το Μάιο και Νοέμβριο του 2009 και τους Φεβρουάριο, Οκτώβριο και Νοέμβριο του 2010.



Σχήμα 3.4 Ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών ατόμων για κάθε μήνα στο σταθμό του Αγ. Στεφάνου.

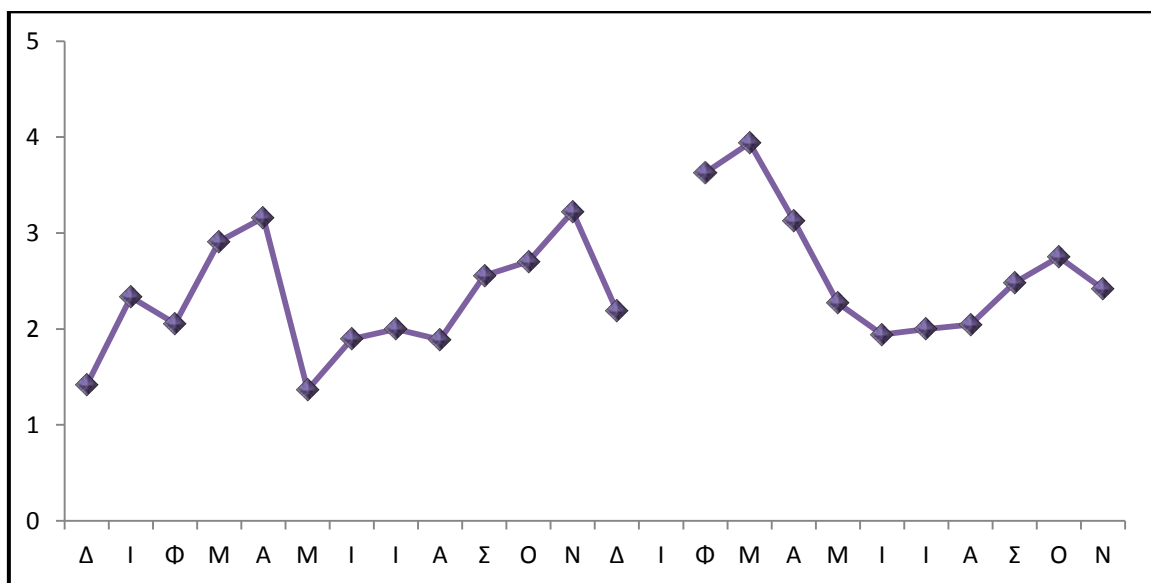


Σχήμα 3.5 Ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των αρσενικών ατόμων για κάθε μήνα στο σταθμό του Αγ. Στεφάνου.

Όπως φαίνεται από την ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών γονάδων για το σταθμό του Αγ. Στεφάνου, τα θηλυκά άτομα φαίνεται πως ακολουθούν ένα εποχικό πρότυπο με δύο κύκλους ωρίμανσης των γονάδων τους κατά τη διάρκεια του χρόνου. Ο πρώτος κύκλος ωρίμανσης αρχίζει κατά τους χειμερινούς μήνες Δεκέμβριο με Ιανουάριο και ολοκληρώνεται κατά τα τέλη της άνοιξης ή αρχές καλοκαιριού Απρίλιο με Ιούνιο, όπου ο δεύτερος κύκλος ξεκινάει για να λήξει κατά τους πρώτους χειμερινούς μήνες (Δεκέμβριο – Ιανουάριο).

Το πρότυπο αυτό φαίνεται να ακολουθείται και τις δύο χρονιές που εξετάστηκαν, με μία μικρή καθυστέρηση κατά το 2010.

Το παραπάνω πρότυπο, των δύο κύκλων ωρίμανσης των γονάδων, μπορεί να παρατηρηθεί πιο καθαρά από την πορεία του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε με βάση τα στάδια ωριμότητας των θηλυκών ατόμων (Σχ. 3.6).



Σχήμα 3.6 Πορεία του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε με βάση τα θηλυκά άτομα, για τον πληθυσμό του Αγ. Στεφάνου

Όσο αφορά την κατανομή των σταδίων ωριμότητας των αρσενικών γονάδων, δεν παρουσιάζει κάποιο πρότυπο, ωστόσο άτομα στο στάδιο ωριμότητας 3 που είναι το στάδιο της εμφάνισης σπέρματος υπάρχει σε όλους σχεδόν τους μήνες οπότε δε

φαίνεται πως τα αρσενικά άτομα διαδραματίζουν κάποιον περιοριστικό παράγοντα όσον αφορά την αναπαραγωγή του είδους.

Η ποσοστιαία συμμετοχή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών ατόμων στον σταθμό της Κάτω Γατζέας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7 και είχε ως εξής:

Το στάδιο των κενών γονάδων (στάδιο ωριμότητας 1), εμφανίστηκε σχεδόν σε όλους τους μήνες με διάφορα ποσοστά συμμετοχής. Χαρακτηριστική είναι η παντελής απουσία του κατά τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο και στις δύο χρονιές. Το μέγιστο ποσοστό συμμετοχής εμφανίστηκε και για τα δύο χρόνια το Μάιο με ποσοστό περίπου 50%.

Το στάδιο αναδιοργάνωσης (στάδιο ωριμότητας 2), παρατηρείται στους περισσότερους μήνες, με απόλυτη συμμετοχή (100%) και τα δύο χρόνια κατά τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο. Χαρακτηριστική είναι η ολοκληρωτική απουσία του σταδίου κατά τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο και τα δύο χρόνια.

Το στάδιο ανάπτυξης (στάδιο ωριμότητας 3), απουσίαζε από αρκετούς μήνες κατά το 2009 σε αντίθεση με το 2010 που εμφανίστηκε σχεδόν σε όλους τους μήνες. Τον Σεπτέμβριο και τον δύο χρόνων αποτελούσε περίπου το 45% του ποσοστού συμμετοχής των σταδίων στον πληθυσμό.

Το στάδιο ωρίμανσης (στάδιο ωριμότητας 4), εμφανίζεται σχεδόν σε όλους τους μήνες με σχεδόν ολοκληρωτική απουσία κατά του καλοκαιρινούς μήνες Μάιο – Αύγουστο και για τα δύο χρόνια και κατά το Δεκέμβριο του 2009.

Τέλος το στάδιο των ώριμων ωοκυττάρων (στάδιο ωριμότητας 5), εμφανίζεται μόνο κατά τους μήνες Μάρτιο – Απρίλιο και Οκτώβριο – Νοέμβριο και τα δύο χρόνια, με χαμηλά ποσοστά μέχρι 17,6% το Μάρτιο του 2010.

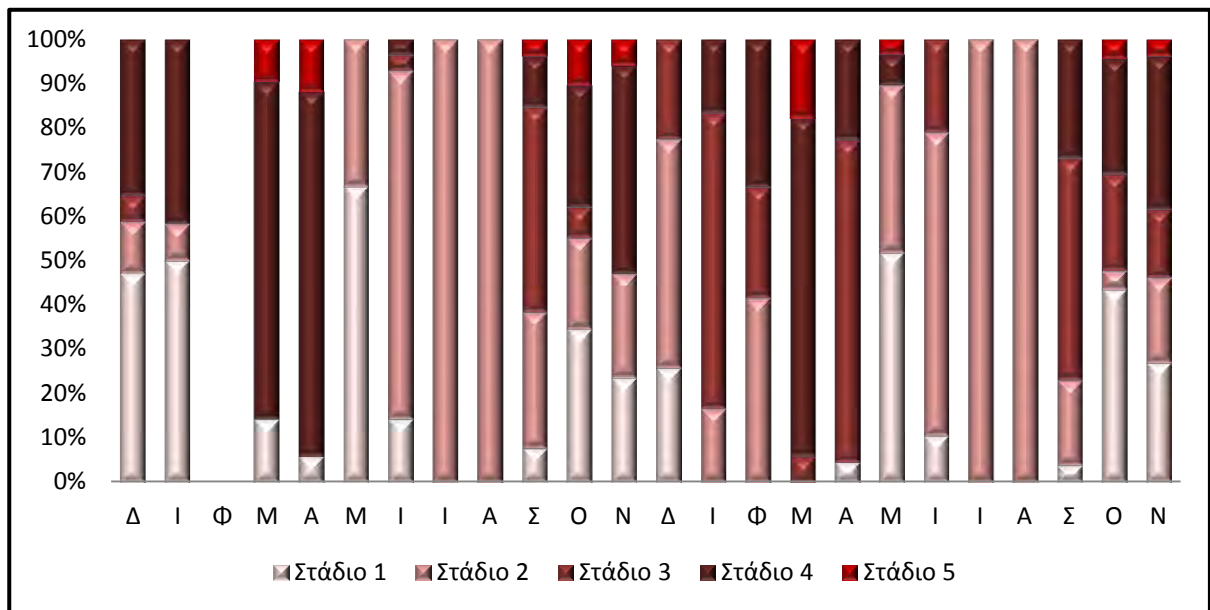
Η συμμετοχή των σταδίων των αρσενικών ατόμων για την περιοχή της Κάτω Γατζέας, απεικονίζεται γραφικά στο σχήμα 3.8 και είχε ως εξής:

Το στάδιο των κενών γονάδων (στάδιο ωριμότητας 1), εμφανίστηκε σε αρκετές δειγματοληψίες εκτός από τους μήνες Ιανουάριο, Ιούνιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο και για τις δύο χρονιές.

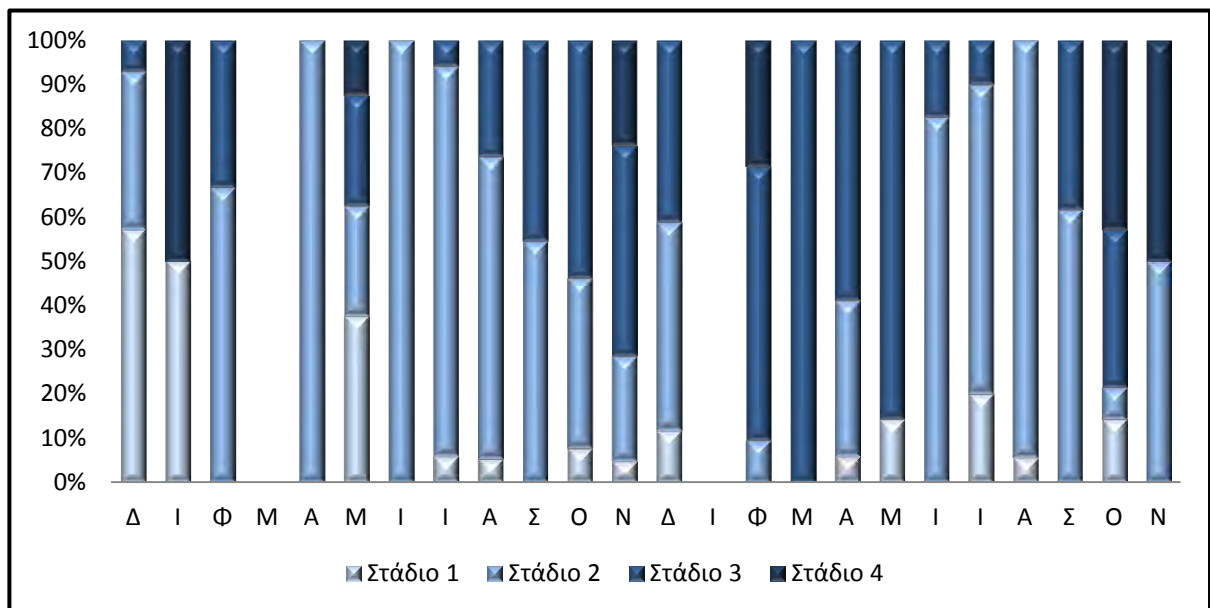
Το στάδιο αναδιοργάνωσης (στάδιο ωριμότητας 2), εμφανίζεται σχεδόν σε όλες τις δειγματοληψίες με μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και με απόλυτη συμμετοχή (100%) κατά τους Ιούλιο του 2009 και Ιούνιο του 2010.

Το στάδιο της εμφάνισης σπέρματος (στάδιο ωριμότητας 3), εμφανίστηκε και αυτό σχεδόν σε όλους τους μήνες εκτός από τους Μάρτιο και Ιούλιο για το 2009 και τον Ιούνιο του 2010.

Το στάδιο της αναπαραγωγής (στάδιο ωριμότητας 4), εμφανίζεται μόνο σε περιορισμένους μήνες κατά τη χειμερινή περίοδο και για τα δύο χρόνια.



Σχήμα 3.7 Ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών ατόμων για κάθε μήνα στο σταθμό της Κάτω Γατζέας.



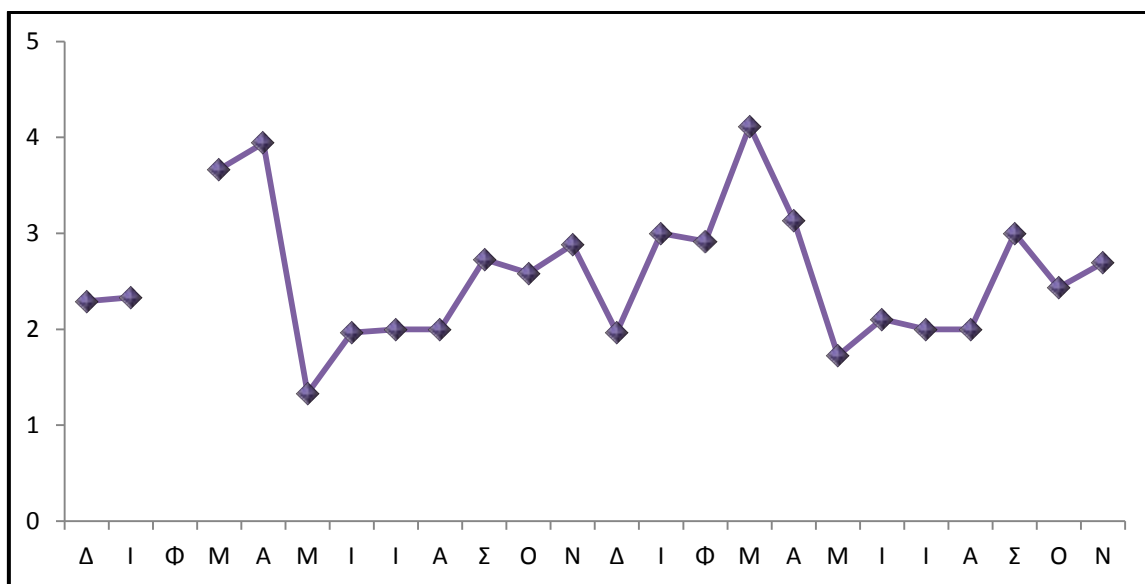
Σχήμα 3.8 Ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των αρσενικών ατόμων για κάθε μήνα σταθμό της Κάτω Γατζέας.

Και στην Κάτω Γατζέα όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από την ποσοστιαία κατανομή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών γονάδων, τα θηλυκά άτομα εμφανίζουν μία εποχικότητα του κύκλου ωριμότητας τους με δύο κύκλους κατά τη διάρκεια του έτους.

Ο πρώτος κύκλος ωρίμανσης αρχίζει κατά τους χειμερινούς μήνες (Δεκέμβριο) και ολοκληρώνεται κατά τα τέλη της άνοιξης ή αρχές καλοκαιριού Απρίλιο με Ιούνιο, όπου ο δεύτερος κύκλος ξεκινάει για να λήξει κατά τους πρώτους χειμερινούς μήνες, Νοέμβριο με Δεκέμβριο.

Το πρότυπο αυτό φαίνεται να ακολουθείται και τις δύο χρονιές που εξετάστηκαν, με μία μικρή καθυστέρηση και σε αυτή την περιοχή κατά το 2010.

Το παραπάνω πρότυπο, των δύο κύκλων ωρίμανσης των γονάδων, μπορεί να παρατηρηθεί πιο καθαρά από την πορεία του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε με βάση τα στάδια ωριμότητας των θηλυκών ατόμων (Σχ. 3.9).



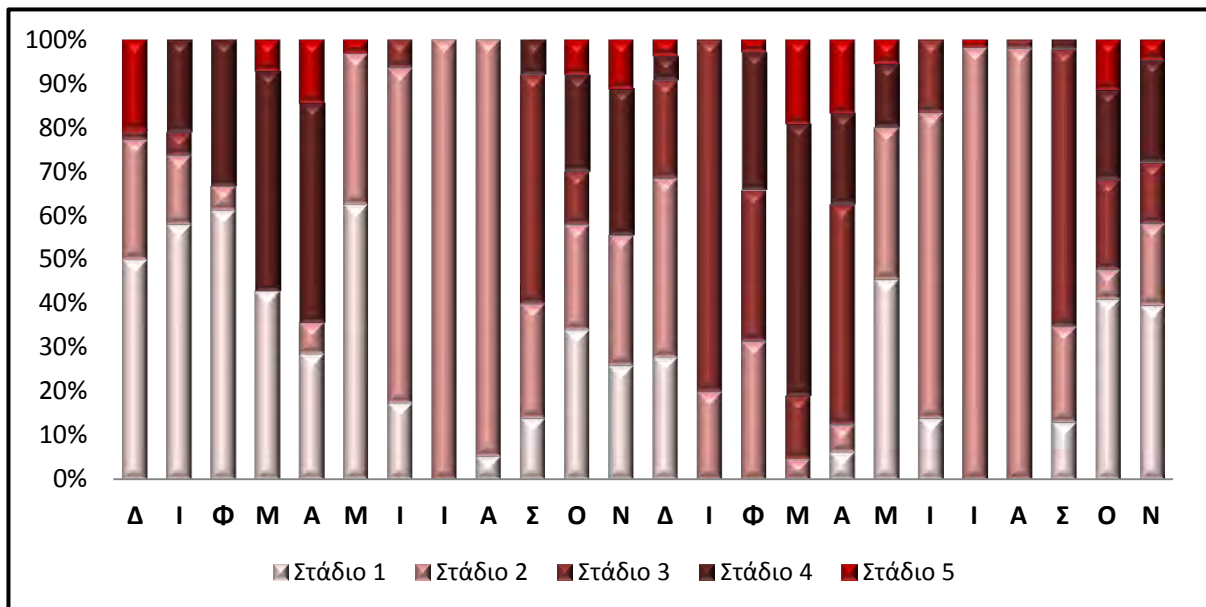
Σχήμα 3.9 Πορεία του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε με βάση τα θηλυκά άτομα, για τον πληθυσμό της Κάτω Γατζέας.

Όσο αφορά την κατανομή των σταδίων ωριμότητας των αρσενικών γονάδων, όπως και στον Αγ. Στέφανο έτσι και στην Κάτω Γατζέα δεν παρουσιάζει κάποιο

πρότυπο, ωστόσο άτομα στο στάδιο ωριμότητας 3 που είναι το στάδιο της εμφάνισης σπέρματος υπάρχει και εδώ, σε όλους σχεδόν τους μήνες. Φαίνεται λοιπόν πως τα αρσενικά άτομα δε διαδραματίζουν κάποιον περιοριστικό παράγοντα όσον αφορά την αναπαραγωγή του είδους.

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω οι δύο πληθυσμοί δε διαφοροποιούνται ως προς τους κύκλους ωριμότητας των γονάδων τους. Μπορούμε λοιπόν να θεωρήσουμε αυτούς τους δύο πληθυσμούς ως ένα απόθεμα αντιπροσωπευτικό του Παγασητικού κόλπου, ως προς τον αναπαραγωγικό του κύκλο.

Στο Σχήμα 3.10 λοιπόν, παρουσιάζεται η κατανομή των σταδίων ωριμότητας των γονάδων των θηλυκών ατόμων, συνολικά και για τους δύο πληθυσμούς, ενώ στο Σχήμα 3.11 απεικονίζεται η πορεία του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε με βάση τα στάδια ωριμότητας των θηλυκών ατόμων.

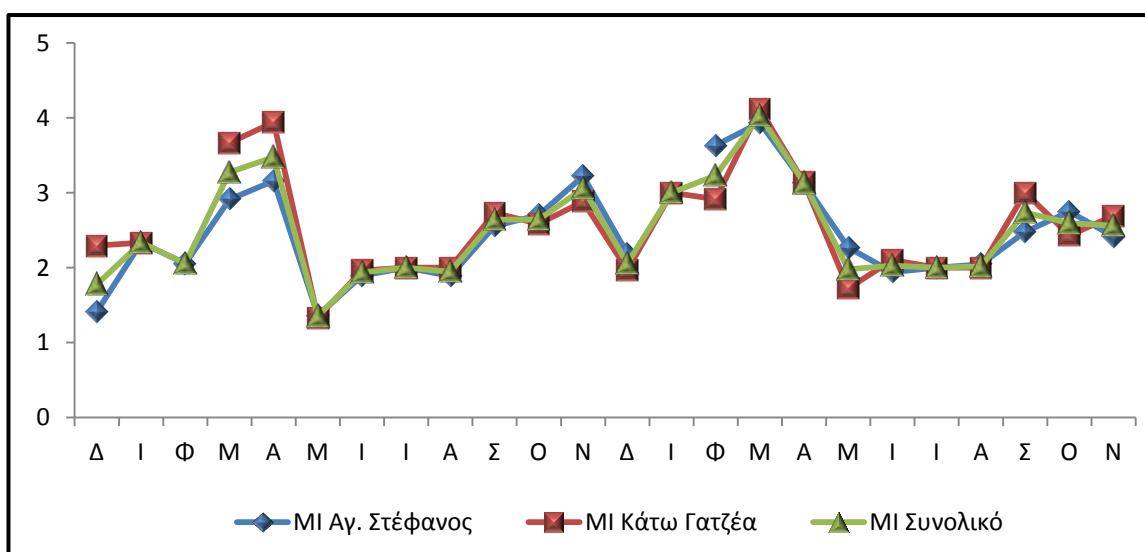


Σχήμα 3.10 Ποσοστιαία συμμετοχή των σταδίων ωριμότητας των θηλυκών γονάδων συνολικά και για τους δύο πληθυσμούς.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 3.10, η πλειοψηφία των γονάδων των θηλυκών ατόμων κατά τους μήνες Μάρτιο με Μάιο βρίσκονται στα στάδια ωριμότητας 4 και 5, δηλαδή στα τελευταία στάδια ωριμότητας. Τους επόμενους μήνες οι συντριπτική πλειοψηφία των γονάδων βρίσκονται στο στα στάδιο 1 και 2, δηλαδή στα πρώτα στάδια του κύκλου ωριμότητας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως ανάμεσα σε αυτούς τους μήνες η πλειοψηφία των ατόμων του πληθυσμού απελευθερώνει στο περιβάλλον μαζικά γεννητικό υλικό, δηλαδή ο πληθυσμός αναπαράγεται.

Η ίδια συμπεριφορά φαίνεται να ακολουθείτε και κατά τους χειμερινούς μήνες, με μικρότερη όμως συχνότητα. Κατά τους πρώτους χειμερινούς μήνες (Οκτώβριο – Νοέμβριο), εμφανίζονται άτομα με γονάδες στα τελευταία σταδία ωριμότητας, στο 4 και 5 δηλαδή. Τους επόμενους μήνες (Δεκέμβριο – Ιανουάριο), τα στάδια αυτά αντικαθίστανται από αρχικά στάδια του κύκλου ωριμότητας των γονάδων. Φαίνεται λοιπόν πως ο πληθυσμός απελευθερώνει ξανά γεννητικό υλικό. Αυτή η δεύτερη αναπαραγωγή που υποδηλώνεται είναι βέβαια μικρότερης κλίμακας από την πρώτη, παρόλα αυτά φαίνεται πως αποτελεί μία ξεχωριστή περίοδο αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό τονίζεται καθώς σε αρκετές μελέτες έχει προταθεί πως το είδος μπορεί να εμφανίσει και μία δεύτερη περίοδο αναπαραγωγής στη Μεσόγειο, η οποία όμως δεν μπορεί να χαρακτηριστεί με ακρίβεια ως ξεχωριστή περίοδο αναπαραγωγής ή απλώς η συνέχεια μίας παρατεταμένης καλοκαιρινής περιόδου. το απόθεμα του Παγασητικού κόλπου, εμφανίζει ετήσιο αναπαραγωγικό κύκλο με δύο περιόδους αναπαραγωγής. Από την παρούσα μελέτη προκύπτει πως πρόκειται για έναν νέο ολοκληρωμένο κύκλο ωριμότητας των γονάδων, καθώς στο χρονικό περιθώριο που μεσολαβεί ανάμεσα στις δύο περιόδους μπορεί να παρατηρηθεί η πλήρης πορεία του κύκλου, με όλα τα στάδια ωριμότητας να εμφανίζονται διαδοχικά.

Τα παραπάνω μπορούν να γίνουν αντιληπτά ακόμα πιο εύκολα, με την παρατήρηση της πορείας του δείκτη ωριμότητας (Σχ. 3.11). Στην παρούσα μελέτη ο δείκτης ωριμότητας μπορούσε να πάρει τιμές από 1 έως 5, καθώς αποτελεί τον αριθμητικό μέσο του συνόλου των σταδίων ωριμότητας που παρατηρούνται για έναν πληθυσμό. Όσο πιο κοντά στη μέγιστη τιμή του πλησιάζει ο δείκτης σημαίνει πως τόσο περισσότερα άτομα υπάρχουν στον πληθυσμό που βρίσκονται στο στάδιο ωριμότητας 5, δηλαδή οι γονάδες τους είναι ώριμες και έτοιμες να αναπαραχθούν. Η πτώση του δείκτη σηματοδοτεί την έναρξη της αναπαραγωγής καθώς από τα ώριμα στάδια ξαφνικά παρατηρούνται στον πληθυσμό ανώριμα στάδια (πιο κοντά στη μονάδα). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε και η συγκεκριμένη σειρά κατά τον προσδιορισμό των σταδίων ωριμότητας. Δηλαδή στα πιο ώριμα και πλησιέστερα στην αναπαραγωγή στάδια να αντιστοιχεί μεγαλύτερος αριθμός σταδίου, σε αντίθεση με άλλες μελέτες (Sanchez – Espana 2004), στις οποίες ο μεγαλύτερος αριθμός αντιστοιχεί στο τελευταίο στάδιο του κύκλου ωριμότητας, γεγονός που ίσως να οδηγήσει σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων του δείκτη.



Σχήμα 3.11 Πορεία του δείκτη ωριμότητας για κάθε σταθμό ξεχωριστά και συνολικά και για τους δύο σταθμούς.

Η παρατήρηση της πορείας του δείκτη ωριμότητας που υπολογίστηκε από τα στάδια ωριμότητας των θηλυκών γονάδων φαίνεται πως ο δείκτης εμφανίζει δύο πτώσεις κατά τη διάρκεια του έτους. Η πρώτη τοποθετείται μεταξύ των μηνών Μαρτίου και Μαΐου, όπου ο δείκτης από τη μέγιστη τιμή που εμφανίζει κατά τον Μάρτιο, μειώνεται απότομα. Ενώ η δεύτερη κατά τους Νοέμβριο και Δεκέμβριο. Οι δύο πτώσεις αυτές υποδηλώνουν το γεγονός πως ενώ το Μάρτιο το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού βρίσκονταν σε υψηλά στάδια ωριμότητας μέσα στους επόμενους δύο μήνες τα άτομα αυτά αντικαταστάθηκαν από άτομα με ανώριμα στάδια γονάδων. Αντίστοιχα και κατά το Νοέμβριο τα άτομα που βρέθηκε να έχουν γονάδες σε ώριμα στάδια το Δεκέμβριο είχαν αντικατασταθεί από άτομα με ανώριμου σταδίου γονάδες.

Φαίνεται λοιπόν πως ο πληθυσμός του *P. lividus* στον Παγασητικό κόλπο, εμφανίζει εποχικό πρότυπο αναπαραγωγής με 2 περιόδους. Η πρώτη κατά τα τέλη της άνοιξης μεταξύ των μηνών Μαρτίου και Απριλίου και η δεύτερη κατά τα τέλη Φθινοπώρου ή κατά τους πρώτους χειμερινούς μήνες Νοέμβριο με Ιανουάριο.

Παρόμοιες αναφορές, για δύο περιόδους αναπαραγωγής του είδους δε λείπουν από τη βιβλιογραφία (Guettaf et al. 2000, Ourens et al. 2010), παρόλα αυτά οι αναφορές αυτές στηρίζονται μόνο σε δεδομένα του γοναδοσωματικού δείκτη και δεν επιβεβαιώνονται από ιστολογική ανάλυση των γονάδων. Έτσι η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων αυτών χωλαίνει, καθώς όπως αναφέρθηκε η πορεία του γοναδοσωματικού δείκτη μπορεί εύκολα να παρερμηνευτεί και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα όσον αφορά τις περιόδους αναπαραγωγής των εχινοειδών.

Οι έρευνες που χρησιμοποιούν ιστολογικά ευρήματα για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγικής περιόδου του είδους αναφέρουν μία περίοδο αναπαραγωγής τόσο για

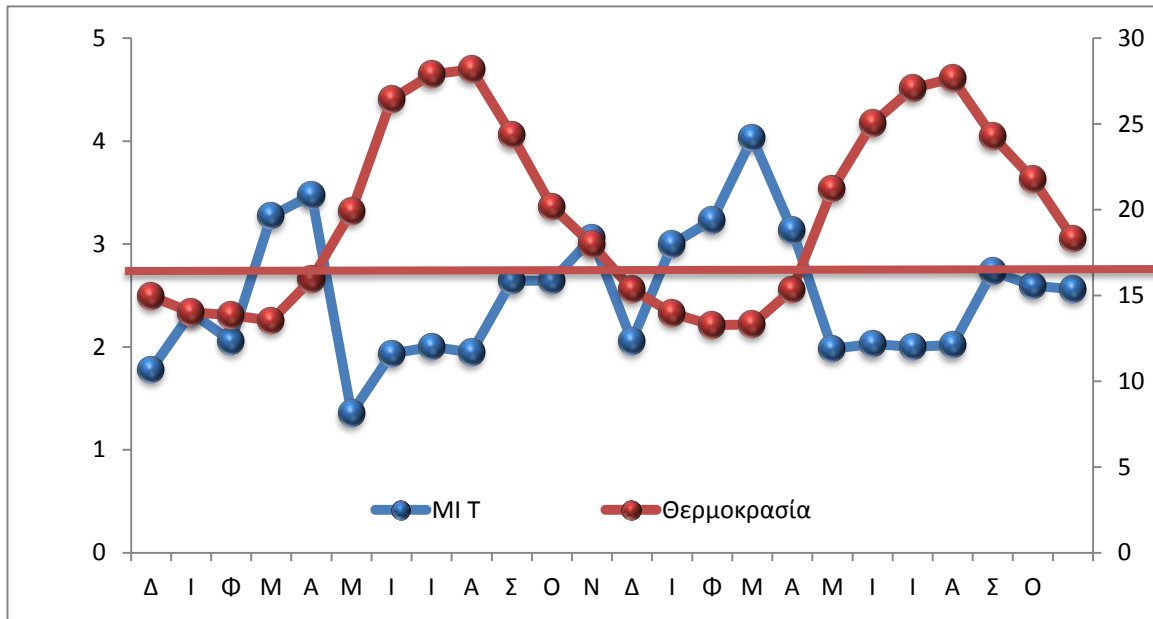
πληθυσμούς του Ατλαντικού ωκεανού (Byrne 1990) όσο και για πληθυσμούς της Μεσογείου (Lozano 1995, Sancez – Espana 2004, Sellem & Guillou 2007).

Εμφανίζει λοιπόν αρκετό ενδιαφέρον η δεύτερη περίοδος αναπαραγωγής του είδους στον Παγασητικό κόλπο, ιδίως επειδή εμφανίζεται κατά τους χειμερινούς μήνες του έτους, σε αντίθεση με άλλες περιοχές που το είδος αναπαράγεται αποκλειστικά κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Και αυτό επειδή η αναπαραγωγή συσχετίζεται κυρίως με τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα της τροφής. Συγκεκριμένα το είδος αναπαράγεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και όταν υπάρχει επάρκεια σε φυτική βιομάζα (φυτοπλαγκτικές ανθίσεις) (Guettaf 2000), κάτι που στην πλειοψηφία των περιοχών συμβαίνει κατά τους καλοκαιρινούς μήνες ή στις αρχές του φθινοπώρου.

Βέβαια η ύπαρξη χειμερινής αναπαραγωγής θα μπορούσε να εξηγηθεί λόγω της ιδιαιτερότητας που εμφανίζει ο Παγασητικός κόλπος. Πρόκειται για έναν αρκετά κλειστό και σχετικά αβαθή κόλπο, ο οποίος τροφοδοτείται με θρεπτικά υλικά καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, μιας και οι κύριες πηγές θρεπτικών υλικών του κόλπου είναι από τις χρήσεις γης που δραστηριοποιούνται όλο το χρόνο και από τη βιομηχανοποίηση και αστικοποίηση των γύρω περιοχών που επίσης τροφοδοτούν τον κόλπο με μία σταθερή ετήσια εισροή θρεπτικών. Ακόμα οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες που εμφανίζει ο κόλπος καθ' όλη τη χρονιά δε φαίνεται πως αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την αναπαραγωγή του είδους.

Ακόμα κάτι ενδιαφέρον που παρατηρήθηκε είναι πως φαίνεται ότι ο κύκλος ωριμότητας των γονάδων και γενικότερα η αναπαραγωγή του είδους, επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία. Φαίνεται πως υπάρχει ένα κρίσιμο θερμοκρασιακό σημείο που επηρεάζει το είδος, είτε άμεσα δρώντας ως περιβαλλοντικός καθοριστικός παράγοντας που πυροδοτεί τα αναπαραγωγικά συμβάντα, είτε έμμεσα επηρεάζοντας

άλλους βιολογικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα τη διαθεσιμότητα τροφής. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως όταν η θερμοκρασία του νερού πλησιάζει αυτό το κρίσιμο σημείο (Σχ. 3.12), που φαίνεται να είναι οι γύρω στους 16°C, είτε αυτή ανεβαίνει είτε πέφτει ο πληθυσμός αναπαράγεται.



Σχήμα 3.12 Συσχέτιση δείκτη ωριμότητας με τη θερμοκρασία της υδάτινης στήλης

3. 4 Παρουσία Ερμαφρόδιτων ατόμων

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την ύπαρξη ερμαφρόδιτων ατόμων σε πληθυσμούς δίοικων εχινοειδών (Booolootian & Moore 1956, Lawrence 1987). Παρόλα αυτά, για τον κοινό αχινό *P. lividus*, η σχετική, με φαινόμενα ερμαφρόδιτων ατόμων βιβλιογραφία, εμφανίζεται αρκετά περιορισμένη, με μόνο την εργασία του Byrne (1990), να εμφανίζει τέτοια στοιχεία και αυτή αναφέρεται για πληθυσμό του Ατλαντικού.

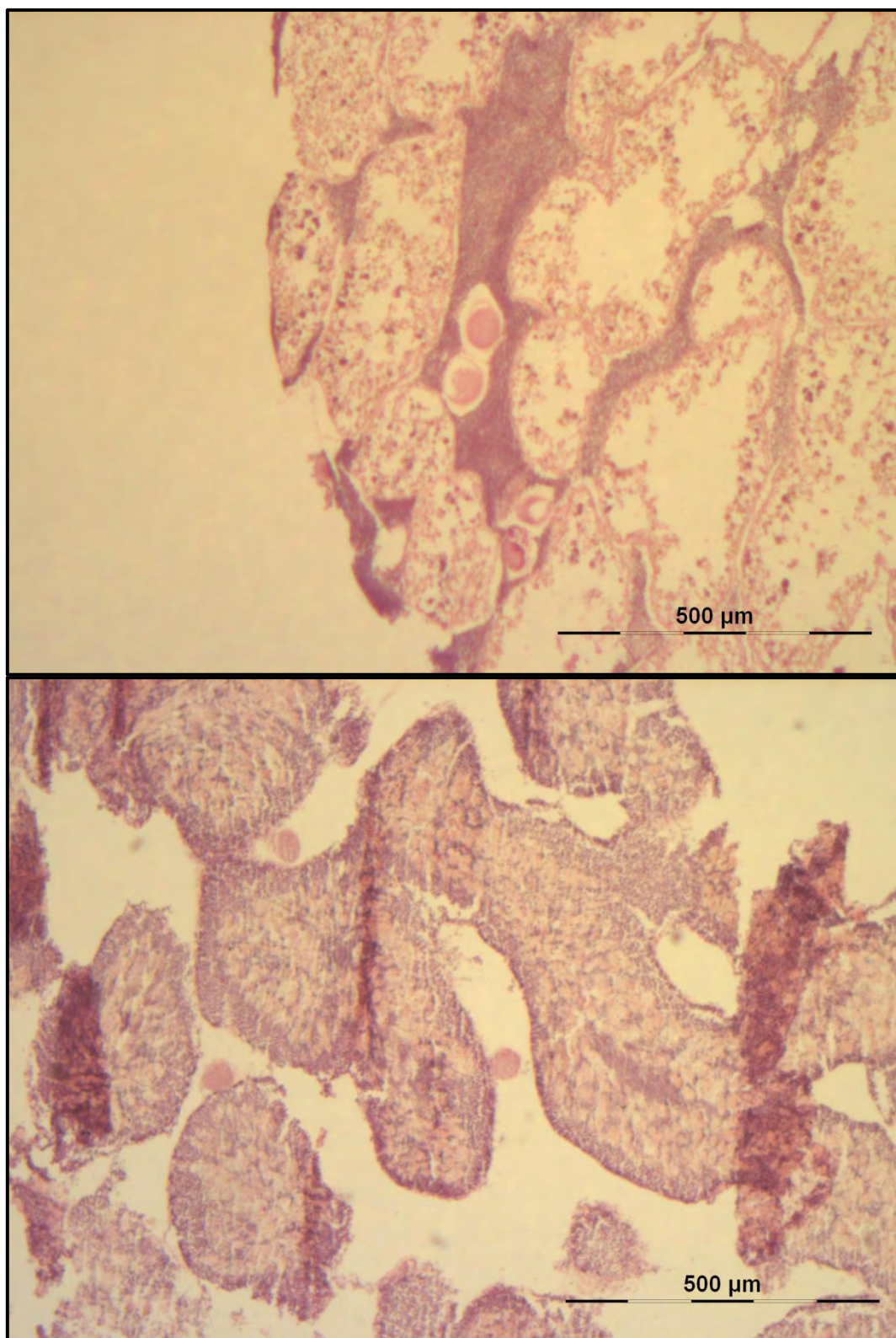
Όσο αφορά πληθυσμούς της Μεσογείου δε φαίνεται να υπάρχουν μελέτες που να υποστηρίζουν τέτοια φαινόμενα. Βέβαια το γεγονός αυτό πιθανόν να

οφείλεται στην απουσία ερευνών που να στηρίζονται σε ιστολογική μελέτη, καθώς μόνο μέσα από ιστολογική ανάλυση των γονάδων μπορεί να παρατηρηθεί ο ερμαφροδιτισμός στα εχινοειδή (Gonor 1973).

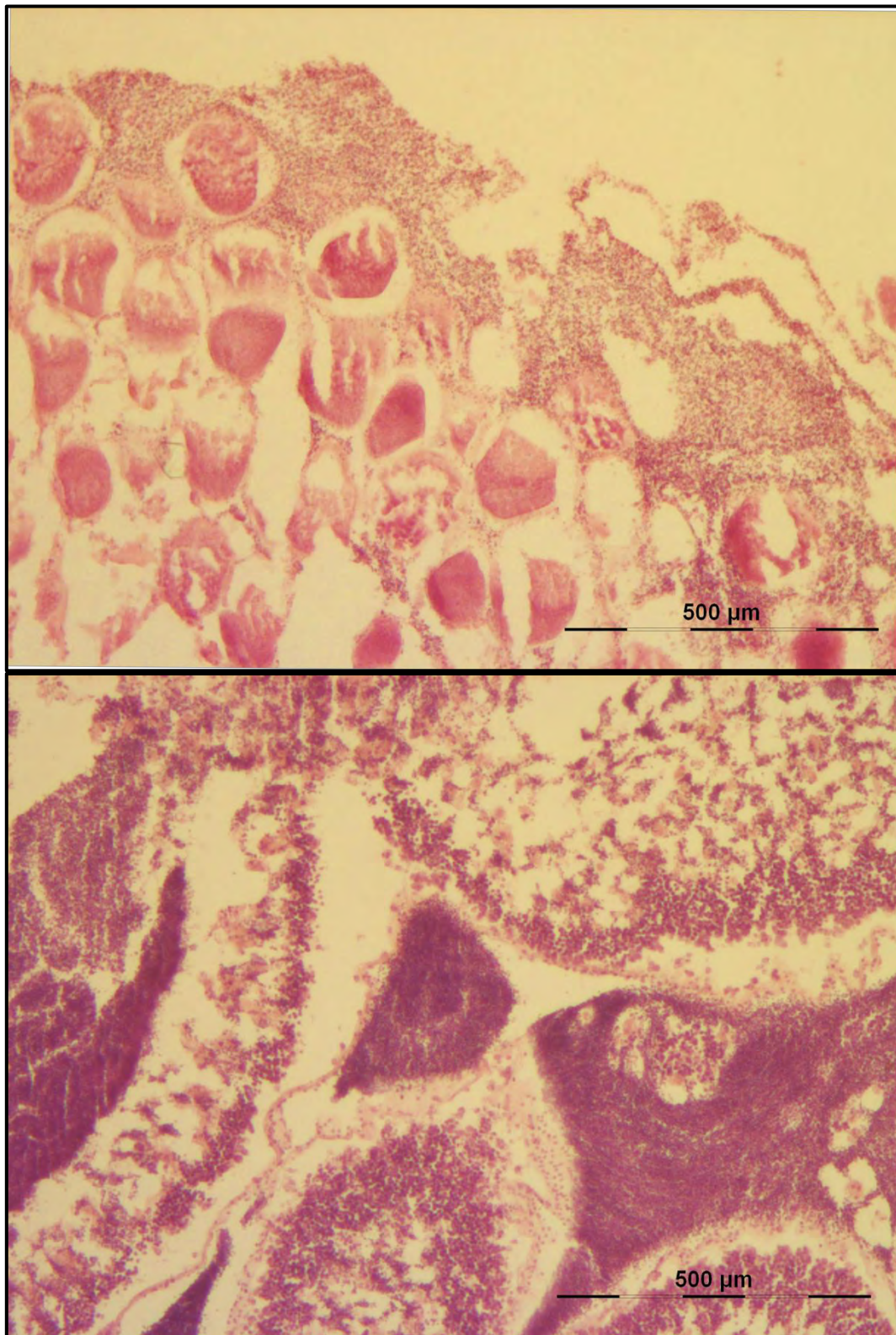
Στην παρούσα μελέτη, από τα 1.521 άτομα που εξετάστηκαν ιστολογικά, τα 39 άτομα (2,56%) εμφάνισαν στοιχεία ερμαφροδιτισμού. Όπως φαίνεται στις εικόνες ακολουθούν παρατηρήθηκαν τόσο θηλυκές γονάδες με ίχνη σπέρματος όσο και αρσενικές γονάδες με ωοκύτταρα, μέσα στις σπερματοκύστεις ή στον περιβάλλοντα χώρο ανάμεσα τους.

Ερμαφρόδιτα άτομα εμφανίστηκαν και στις δύο περιοχές του κόλπου που εξετάστηκαν και για τα δύο χρόνια, χωρίς να παρουσιάζουν κάποια εποχικότητα μεταξύ των διαφορετικών μηνών δειγματοληψίας.

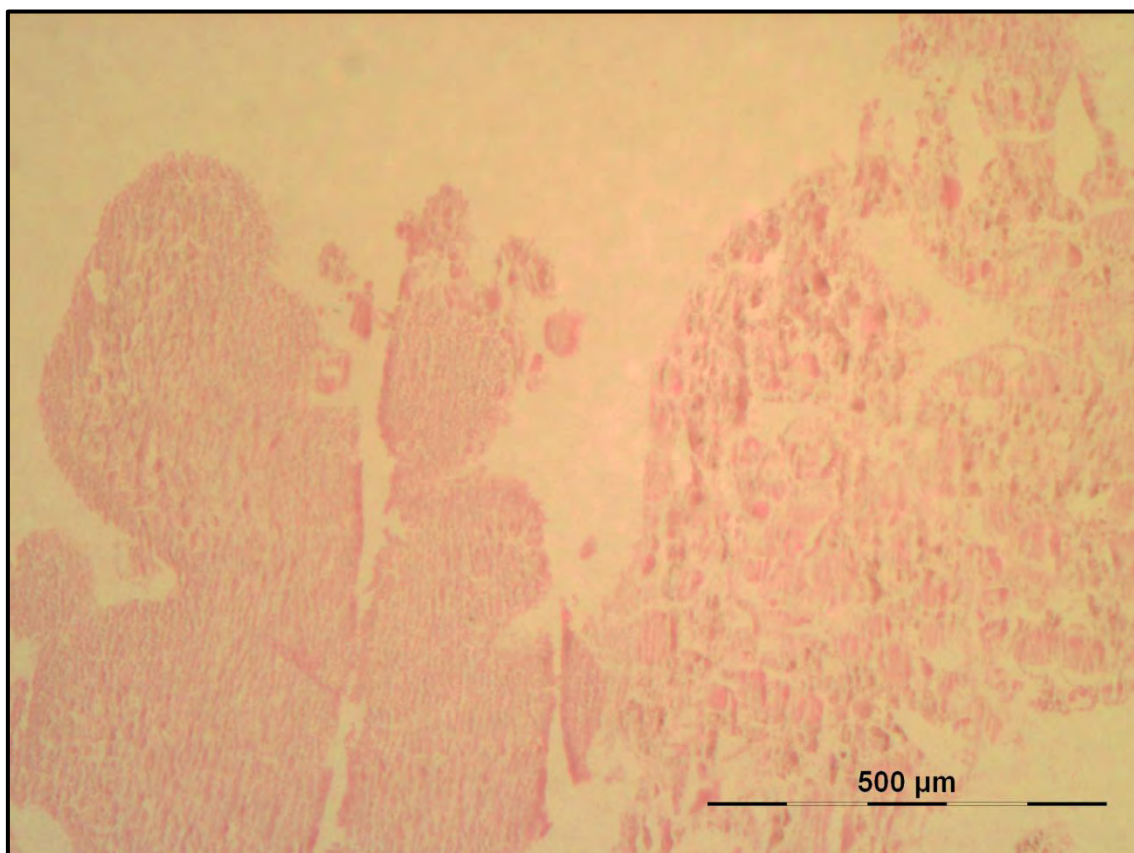
Τα ευρήματα αυτά αποτελούν έναν ακόμα επιχείρημα σχετικά με την υπεροχή της ιστολογικής ανάλυσης, έναντι των μακροσκοπικών μεθόδων, οι οποίες στην προκειμένη περίπτωση δε θα ήταν σε θέση να εντοπίσουν τα ερμαφρόδιτα άτομα.



Εικόνα 3.10. Φωτογραφίες από τομές ερμαφρόδιτων ατόμων. Μπορούν να παρατηρηθούν ώριμα ωοκύτταρα ανάμεσα στις σπερματοκύστες.



Εικόνα 3.11 Στην επάνω φωτογραφία παρατηρούνται σπερματοζώαρια περιμετρικά μερικών ώριμων ωοκυττάρων. Στην κάτω ώριμα ωοκύτταρα εμφανίζονται στο μέσο κοιλοτήτων σπέρματος.



Εικόνα 3.12 Ταυτόχρονη παρουσία σπερματοκύστεων (αριστερά) και ωοθυλακίων (δεξιά).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, φαίνεται πως οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν δε διαφοροποιούνται αναπαραγωγικά και έτσι μπορεί να θεωρηθεί πως το είδος στον Παγασητικό αντιπροσωπεύεται από έναν πληθυσμό.

Το είδος *P. lividus* στον Παγασητικό κόλπο φαίνεται πως έχει δύο περιόδους αναπαραγωγής. Μία στα τέλη της Άνοιξης μεταξύ Μαρτίου – Μαΐου και μία κατά τους χειμερινούς μήνες Νοέμβριο με Ιανουάριο. Και στις δύο περιπτώσεις τα αναπαραγωγικά συμβάντα φαίνεται πως πιθανότατα πυροδοτούνται από τη θερμοκρασία.

Τέλος η έρευνα έδειξε πως τα θηλυκά άτομα ήταν κυρίαρχα έναντι των αρσενικών με αναλογία 1,7:1 καθώς και ότι το είδος εμφανίζει φαινόμενα ερμαφροδιτισμού, σε σχετικά υψηλά ποσοστά (2,56%), αν και αποτελεί ένα γονοχωριστικό εχινοειδές.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ξένη βιβλιογραφία

- Allain J.Y. (1975) Structures des populations de *Paracentrotus lividus*(Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea) soumises a la peche sur les cotes de Bretagne. Reme Trav. Inst. (scient tech.) Pech. Marit., 39:171-209
- Antoniadou C., Vafidis D.,(2009) Population structure and morphometric relationships of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in the South Aegean Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 50: 293- 301.
- Bayed A., Quiniou F., Benhra A., Guillou M. (2005) The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast: growth, reproduction and health condition. *Journal of the Marine Biological Association of the U*, 85: 999-1007
- Byrne M. (1990) Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, 104: 275-289
- Fenaux L. (1968) Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *Arbacia lixula* (L.), *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus macrolltberculnrus* (Echinides) à Villefranche-sur-Mer. *Vie et Milieu*, 19:1-52
- Gago J., Range P., Luis O. (2003) Growth, reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. In: *Echinoderm Research 2001: proceedings of the 6th European Conference on Echinoderm Research*, Banyuls-sur-mer, 3-7 September 2001. (Ed. Féral, J.-P.; David, B.) pp. 269-276
- Gonor, J. J. (1973). Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). I. Annual gonad growth and ovarian gametogenic cycles. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 12:45-64
- Gonzalez-Irusta J.M., Goni De Cerio F., Canteras J.C. (2010) Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (northern Spain): environmental effects. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90: 699–709
- Grosjean P. (2001) Growth model of the reared sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Ph. D. Thesis, Universite Libre De Bruxelles, pp. 272
- Guettaf M., Gustavo A., Martin S., Francour P. (2000) Interpopulation variability of the reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in the south-western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80: 899-907
- Jons G. D., Miranda L. E (1997) Ovarian weight as an index of fecundity, maturity, and spawning periodicity. *Journal of Fish Biology*, 50: 150–156

- Koukouras A., Sinis A.I., Bobori D., Kazantzidis S., Kitsos M.S. (2007) The echinoderm (Deuterostomia) fauna of the Aegean Sea, and comparison with those of the neighbouring seas. *Journal of Biological Research*, 7: 67-92
- Lawrence A, Hemingway K.I. (2003) *Effects of Pollution on Fish*. Blackwell, Oxford
- Lawrence J.M. (1987) "A functional biology of echinoderms". London: Croom Helm. pp.340
- Lozano J., Galera J., Lopez S., Turon X., Palacin C., Morera, (1995) Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Marine Biology Progress Series*, 122: 179-191.
- Martinez – Pitta I., Sanchez – Espana A., Garcia F. (2008) Gonadal growth and reproduction in the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck 1816) (Echinodermata: Echinoidea) in southern Spain. *Scientia Marina*, 72:603-611
- Ourens R., Fernandez L., Freire J. (2010) Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*,
- Pearse, J.S., Cameron, R.A. (1991) Echinodermata: Echinoidea. In: Giese A.C., Pearse J.S., Pearse, V.B. (eds.) *Reproduction of marine invertebrates*, Vol. VI: Echinoderms and Lophophorates. Boxwood Press, Pacific Groove, California. Pp 513-662
- Peirano A., Niccolai I., Mauro R., Bianchi N. (2001) Seasonal grazing and food preference of herbivores in a *Posidonia oceanica* meadow. *Scientia Marina* 65: 367-374
- Petes L.E, Menge B.A., Chan F., Webb M.A.H. (2008) Gonadal tissue color is not a reliable indicator of sex in rocky intertidal mussels. *Aquatic biology*, 3: 63-70
- Petihakis G., Triantafyllou G., Pollani A., Koliou A., Theodorou A. (2005) Field data analysis and application of a complex water column biogeochemical model in different areas of a semi-enclosed basin: towards the development of an ecosystem management tool. *Marine Environmental Research*, 59: 493–518
- Pinna S., Pais A., Chessa L., Sechi N., Ceccherelli G. (2009) Leaf partitioning of the seagrass *Posidonia oceanica* between two herbivores: Is *Sarpa salpa* herbivory underestimated because of *Paracentrotus lividus* grazing? *Estuary, Coastal and Shelf Science*, 84: 21-27
- Privitera D., Chiantore M., Mangialajo L., Glavic N., Kozul W., Cattaneo- Vietti R., (2008) Inter- and intra-specific competition between *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in resource-limited barren areas. *Journal of Sea Research*, 60: 184-192.
- Sanchez- Espana A.I., Martinez-Pita I., Garcia F.J. (2004) Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata : Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia*, 519: 61-72

- Sellem F., Guillou M. (2007) Reproductive biology of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats of northern Tunisia (south – east Mediterranean). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 763 - 767
- Semroud R., Senoussi Y. (1989) Donneés preliminaires sur l'indice de repletion, l'indice gonadique et le sexe-ratio de *Spaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata, Echinoidea) de la baie d'Alger. Vie Marine Hors. Serie, 10:86-94
- Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Lupatsch I. (2004) The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. Aquaculture, 232: 343-355
- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M. (1998) Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of maturity index. Invertebrate Reproduction and Development, 34:69-81
- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M. (2001) Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. Aquaculture Nutrition, 7:91–99
- Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M. (2000) Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). Aquaculture, 185: 85-99
- Triantafyllou G., Petihakis G., Dounas C., Theodorou A. (2001) Assessing marine ecosystem response to nutrient inputs. Marine Pollution Bulletin 43: 175–186
- Vatilingon D., Rasolofonirina R., Jangoux M. (2005) Reproductive Cycle of Edible Echinoderms from the Southwestern Indian Ocean. Western Indian Ocean Journal of Marine. Science, 4: 47–60

5.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- Castro P., Huber M.E. (1999) Θαλάσσια Βιολογία. UNIVERSITY STUDIO PRESS,Θεσσαλονίκη, σελ.608
- Ιωαννίδη Β. (2011) Πληθυσμιακή δομή του αχινού *Spaerechinus granularis* στον Παρασητικό κόλπο. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Κουσουλάκος Σ.Α. (2007) Εισαγωγή στην Αναπτυξιακή Βιολογία και Ιστολογία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Παρισιανού, Αθήνα, σελ. 482
- Λεγάκις, Α. & Μαραγκού, Π. (επιμ. εκδ). (2009) Το Κόκκινο Βιβλίο των Απειλούμενων Ζώων της Ελλάδας. Ελληνική Ζωολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ.528
- Λόλας Α. (2008) Παραλλακτικότητα των πληθυσμών αχινού στον Παρασητικό κόλπο και στις Σποράδες. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στεργίου Κ.Ι., Καραχλέ Π.Κ., Τσίκληρας Α., Μαμαλάκης Η. (2011) Κραυγή ιχθύος: Ψάρια των Ελληνικών θαλασσών – Βιολογία – Αλιεία – Διαχείριση. Εκδόσεις Πατάκη, Αθήνα, σελ. 358

6. ABSTRACT

Aspects of the reproduction of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), were investigated using histological analysis, in the Pagasitikos gulf.

In order to monitor the developmental cycle of the species gonads, a two – year survey was conducted in two locations along the coastline of the gulf. Forty individuals were randomly collected on a monthly basis using SCUBA diving, in the laboratory every individual was dissected and the gonad development and sex, were determined by histological analysis using the hematoxylin eosin regressive stain. The gonadosomatic index of each individual was calculated as the ratio between the weight of the gonads and the total weight of the sea urchin. The mean value from each sampling was correlated with the mean water temperature.

The sex ratio was estimated in 1.7:1 with a female dominance, in both locations with a significant number of hermaphrodite individuals. As for the developmental cycle five developmental stages were determined for the female gonads and four stages for the male gonads.

The species in Pagasitikos gulf seems to follow a seasonal reproduction pattern with two spawning events. The one in late summer and the other in early winter. From what it seems the spawning and in general the gonadal cycle are possibly influenced by water temperature.

Keywords: Echinodermata, histological analysis, gonadosomatic index, maturity index, Aegean sea